

Université de Montréal

Le rôle de Gas6 dans le métabolisme du glucose

par Amélie Germain

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Université de Montréal

Institut de Recherches Cliniques de Montréal

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M. Sc.)

en Biologie moléculaire

Janvier, 2017

© Amélie Germain, 2017

Résumé

Gas6 est une protéine sécrétée γ -carboxylée de façon dépendante à la vitamine K et fonctionne comme un ligand pour les récepteurs tyrosine kinase de la famille TAM : TYRO3, AXL et MERTK. Plusieurs études chez l'humain suggèrent un rôle potentiel de Gas6 dans la résistance à l'insuline et l'obésité. Cependant, le mécanisme par lequel Gas6 influence la sensibilité à l'insuline est toujours inconnu. Selon nos résultats préliminaires, nous avons posé l'hypothèse que GAS6 régule la sensibilité à l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux via son interaction avec ses récepteurs à la surface des cellules.

Méthodes et résultats : Nous avons observé qu'Axl est le récepteur de Gas6 le plus exprimé dans les adipocytes et les myocytes. De plus, nous avons déterminé qu'AXL et sa cible AKT sont phosphorylés dans les C2C12 différenciées suivant une stimulation avec la protéine Gas6 recombinante. Également, ces événements de phosphorylation sont inhibés par la molécule LDC1267, un inhibiteur des récepteurs TAM. Ensuite, les souris *Gas6*^{-/-} montrent une augmentation de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline. En contraste, les souris transgéniques surexprimant Gas6 présentent une résistance à l'insuline en comparaison avec les souris de type sauvages. Pour investiguer en profondeur les événements moléculaires en aval de Gas6 et ses récepteurs, nous avons caractérisé le transcriptome dépendant de la signalisation Gas6-récepteurs TAM dans les myotubes en utilisant une expérience de séquençage d'ARN. De façon intéressante, nous avons identifié que plusieurs molécules cibles de la signalisation de l'insuline sont modifiées par Gas6.

Ensemble, ces résultats supportent la notion que Gas6 est impliqué dans la régulation de la sensibilité à l'insuline *in vivo*. Cette fonction se produit lors de son interaction avec au moins un de ses récepteurs, soit Axl, à la surface des myotubes.

Mots-clés : Diabète de type 2, Résistance à l'insuline, Métabolisme, Physiologie, Vitamine K

Abstract

Introduction: Gas6 is a secreted protein which is γ -carboxylated in a vitamin K dependent manner and functions as ligand for the TAM family of receptor tyrosine kinases: TYRO3, AXL and MERTK. A few studies in humans suggest a potential role for Gas6 in insulin resistance and obesity. Nevertheless, the mechanisms by which Gas6 influences insulin resistance remain unknown. Based on our preliminary data, we hypothesized that Gas6 regulates insulin sensitivity in muscle and adipose tissue through its interaction with its receptors.

Methods and Results: We observed that Axl is the most highly expressed Gas6 receptor in adipocytes and myocytes. Moreover, we found that Axl and its downstream target AKT are phosphorylated in C2C12 myotubes following stimulation with recombinant Gas6. Importantly, these phosphorylation events are abrogated when cells were pre-treated with LDC1267, a TAM pharmacological inhibitors. In addition, *Gas6*^{-/-} mice display an improved glucose tolerance, associated with increased insulin sensitivity when compared to wild-type mice. In contrast, Gas6 transgenic mice characterized by increased circulating Gas6 levels (*ApoE-Gas6* Tg) have reduced insulin sensitivity. To further investigate the molecular events downstream of Gas6 and of its receptor in muscle cells, we characterized the Gas6/Axl-dependent transcriptome in myotubes using RNAseq. Interestingly, we found that key regulators of the insulin signaling pathway were modulated by Gas6 and Axl.

Conclusion and Relevance: Together, these results support the notion that Gas6 is implicated in the regulation of insulin sensitivity *in vivo*. This function of Gas6 occurs through its interaction with Axl at the surface of myocytes.

Keywords: Type 2 diabetes, Insulin resistance, Metabolism, Physiology, Vitamin K

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii
Chapitre 1. Introduction.....	1
1.1 Le diabète	2
1.1.1 Le diabète de type 2	4
1.1.1.1 Facteurs de risque	5
1.1.1.2 La résistance à l'insuline.....	8
1.2 Le rôle de l'insuline dans l'homéostasie du glucose.....	8
1.2.1 La sécrétion de l'insuline	9
1.2.2 La signalisation de l'insuline	12
1.2.2.1 La voie PI3K-AKT	13
1.2.2.2 La régulation du taux de glucose via les transporteurs de glucose	15
1.2.2.3 La voie de signalisation mTORC1/S6K1	16
1.3 La vitamine K.....	19
1.3.1 Sources de vitamine K	19
1.3.2 La γ -carboxylation et le cycle de la vitamine K.....	21
1.3.3 Protéines dépendantes de la vitamine K : Les protéines Gla	21
1.3.3.1 La protéine GAS6	22
1.3.3.2 Récepteurs tyrosine kinase de la famille TAM.....	23
1.3.3.3 Fonctions biologiques connues de GAS6 et des récepteurs TAM.....	24
1.3.4 La voie de signalisation en aval du récepteur AXL	25
Chapitre 2. Mise en contexte du projet.....	27

2.1	La vitamine K et le métabolisme du glucose	28
2.2	Le rôle potentiel de GAS6 dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète....	29
2.3	Hypothèse et objectifs	31
Chapitre 3. Méthodologie		32
3.1	Souris.....	33
3.1.1	Souris <i>Gas6</i> ^{-/-}	33
3.1.2	Génération de la transgénique pLiv.7-ApoE-GAS6	33
3.2	Analyses métaboliques	33
3.2.1	Analyses métaboliques sur diète riche en gras	34
3.3	Cages métaboliques.....	35
3.4	Culture cellulaire	36
3.4.1	Production du GAS6 recombinant.....	36
3.4.2	Quantification de la protéine GAS6.....	37
3.4.3	Expériences de signalisation <i>in vitro</i>	38
3.5	Immunobuvardage de style Western et immunoprécipitation.....	38
3.5.1	Préparation des échantillons	38
3.5.2	Électrophorèse SDS-PAGE et transfert sur membrane	39
3.5.3	Détection des protéines	40
3.6	Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR quantitative	40
3.7	Séquençage d'ARN	41
3.8	Analyses statistiques.....	42
3.9	Listes des anticorps et oligonucléotides	43
Chapitre 4. Résultats.....		45
4.1	Conséquences d'une perte de fonction de Gas6 sur le métabolisme du glucose <i>in vivo</i>	46
4.2	Conséquences d'un gain de fonction de GAS6 sur le métabolisme du glucose <i>in vivo</i>	54
4.3	Conséquences d'une perte de fonction de GAS6 dans un modèle de résistance à l'insuline (HFD) <i>in vivo</i>	59

4.4	Déterminer si la signalisation dépendante de GAS6 est présente et fonctionnelle dans les cellules sensibles à l'insuline.....	65
4.5	La signalisation induite par GAS6 dans les cellules sensibles à l'insuline	72
Chapitre 5.	Discussion	77
5.1	Expériences futures	82
Chapitre 6.	Conclusion	86
Bibliographie.....		i

Liste des tableaux

Tableau I. Critères de diagnostic de l’hyperglycémie et du diabète selon l’Organisation Mondiale de la Santé.....	3
Tableau II. Tests métaboliques <i>in vivo</i>	35
Tableau III. Conditions du programme d’amplification de qPCR.....	41
Tableau IV. Liste des oligonucléotides utilisés dans ce projet, avec les séquences et l’utilisation de ceux-ci	43
Tableau V. Liste des anticorps utilisés et les conditions de dilution	44
Tableau VI. Voies de signalisation affectées par la signalisation Gas6-récepteurs TAM.....	74

Liste des figures

Figure 1. Développement du diabète de type 2.....	6
Figure 2. Formation de l'insuline et maturation des granules	10
Figure 3. Voie de signalisation de l'insuline.	14
Figure 4. La protéine mTOR entre dans la composition de deux types de complexes actifs, mTORC1 et mTORC2	17
Figure 5. Structure chimique des différentes formes de vitamine K (adapté de [68])......	20
Figure 6. Gamma-carboxylation des protéines dépendantes de la vitamine K et cycle de la vitamine K (adapté de [79]).	22
Figure 7. Représentation schématique du vecteur pLiv7 contenant l'ADNc Gas6-Myc-His utilisé pour générer la souris transgénique surexprimant Gas6 dans le foie.....	34
Figure 8. Différenciation des C2C12	36
Figure 9. Phénotype métabolique des souris déficientes en GAS6 sur fond génétique FVB à 3 mois.....	47
Figure 10. Phénotype métabolique des souris déficientes en GAS6 sur fond génétique C57B6/J à 3 mois.	48
Figure 11. Phénotype énergétique des souris déficientes en GAS6 sur fond génétique FVB à 3 mois.....	50
Figure 12. Phénotype énergétique des souris déficientes en GAS6 sur fond génétique C57B6/J à 3 mois.	51
Figure 13. Signalisation de la voie de l'insuline <i>in vivo</i> dans les souris <i>Gas6</i> ^{-/-} à 3 mois	54
Figure 14. Génération d'un modèle de souris transgénique surexprimant GAS6 dans le foie.	56
Figure 15. Phénotype métabolique des souris transgéniques surexprimant GAS6 dans le foie, sur fond génétique C57B6/J, âgées de 3 et 6 mois.	58
Figure 16. Phénotype métabolique des souris déficientes en GAS6 sur fond génétique FVB sur une diète riche en gras.....	60
Figure 17. Analyses comparatives entre les souris de type sauvage de fond génétique FVB ou C57B6/J.....	61
Figure 18. Phénotype métabolique des souris déficientes en GAS6 sur fond génétique FVB sur une diète riche en gras.....	62

Figure 19. Analyses comparatives des phénotypes métaboliques des souris <i>Gas6</i> ^{-/-} sur fond C57B6/J mises sur une diète normale ou une diète riche en gras, pendant 12 semaines.....	64
Figure 20. Expression de <i>Gas6</i> et ses récepteurs dans différents tissus	66
Figure 21. Expression de <i>Gas6</i> et ses récepteurs dans différents types de muscle et de tissus adipeux de souris sur fond C57B6/J	67
Figure 22. Expression des récepteurs de Gas6 dans le modèle cellulaire de muscle, les C2C12.	68
Figure 23. Production du surnageant GAS6 dans des clones stables HEK293 et phosphorylation dépendante de GAS6 du récepteur AXL	69
Figure 24. Inhibition de la phosphorylation dépendante de GAS6 des récepteurs AXL et AKT avec deux inhibiteurs pharmacologiques, R428 et LDC1267.	71
Figure 25. Expérience de séquençage d'ARN sur des myotubes traités avec GAS6 et/ou l'inhibiteur.....	73
Figure 26. Expression de gènes de la signalisation de l'insuline régulés par la signalisation de Gas6-récepteurs TAM dans l'expérience de séquençage d'ARN dans des muscles gastrocnémiens.....	75

Liste des abréviations

μ	Micro
4E-BP1	eIF4E-binding proteins 1
A	Ampère
AcetylCoA	Acyl coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AKT	Protéine kinase B
ANOVA	Analyse de la variance
ApoE	Apolipoprotéine E
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
AS160	Akt substrate of 160 kDa
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	BCL2-associated agonist of cell death
BAT	Tissu adipeux brun
BM	Moelle osseuse
BSA	Albumine de sérum bovin
Ca ²⁺	Calcium
CO ₂	Dioxyde de carbone
DAG	Diacylglycérol
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNAse	Déoxyribonuclease
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
EDL	Muscle long extenseur des orteils
eIF4E	Eukaryotic initiation factor 4E
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMEM	Eagle's minimum essential medium
eWAT	Tissu adipeux épидидymal
FB	Forebrain
FBS	Sérum de bovin fœtal
FOXO1	Forkhead box protein O1
GAP	GTPase-activating protein
Gas6	Growth arrest-specific gene 6
Gast.	Muscle gastrocnémien
GGCX	γ-Glutamyl-carboxylase
Gla	Résidus d'acide γ-carboxyglutamique
Glu	Résidus d'acide glutamique
GLUT	Transporteur de glucose (Glucose transporter)
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSIS	Test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose

GSK3	Glycogène synthase kinase 3
GTP	Guanosine triphosphate
GTT	Test de tolérance au glucose
HB	<i>Hindbrain</i>
HEK293	<i>Human embryonic kidney 293</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HFD	Diète riche en gras
HS	Sérum de cheval
HuH7	Lignée de carcinome hépatocellulaire
HY	Hypothalamus
IB	Immunobuvardage
Ig	Immunoglobuline
IMC	Indice de masse corporelle
IP	Immunoprécipitation
IP3	Inositol 1,4,5 triphosphates
IR	Récepteur à l'insuline (<i>Insulin receptor</i>)
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
IRS	Substrat du récepteur de l'insuline (<i>Insulin receptor substrate</i>)
ITT	Test de tolérance à l'insuline
kDa	Kilo dalton
KO	<i>Knock-out</i> ou -/-
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MGP	<i>Matrix Gla protein</i>
MK	Ménaquinones
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MODY	<i>Maturity-onset of the young</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
mTORC	<i>Mammalian Target of Rapamycin Complex</i>
Nck2	<i>Non-catalytic region of receptor tyrosine kinase 2</i>
ND	Diète normale
nm	Nanomètre
OCL	Ostéoclastes
Ocn	Ostéocalcine
OMS	Organisation mondiale de la Santé
One-way ANOVA	Analyse de la variance à un facteur de variance
OSB	Ostéoblaste
P/S	Pénicilline/streptomycine
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PC2	Proprotéine convertase 2
PC3	Proprotéine convertase 3
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDK1/2	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1/-2
PDX1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4-5 biphosphate

PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PTB	<i>Phosphotyrosine binding</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTT	Test de tolérance au pyruvate
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RP	<i>Reserve pool</i>
RPM	Révolution par minute
RRP	<i>Readily releasable pool</i>
RTK	Récepteur tyrosine kinase
S	Serine
S6K	Kinase ribosomale S6
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEM	Écart-type de la moyenne
Socs	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
SREBP1/2	<i>Sterol regulatory element binding protein 1/2</i>
sWAT	Tissu adipeux sous-cutané
T	Thréonine
TA	Tibial antérieur
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> avec Tween20
TK	Tyrosine kinase
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
Two-way ANOVA	Analyse de la variance à deux facteurs de variance
UBIAD1	<i>Ubia prenyltransferase containing 1</i>
V	Volt
VCO ₂	Dioxyde de carbone
VK	Vitamine K
VK ₁	Vitamine K1 ou phylloquinone
VK ₂	Vitamine K2 ou ménaquinones
VKOR	Vitamine K époxyde réductase
VO ₂	Consommation d'oxygène
WT	<i>Wildtype</i> ou +/-
Y	Tyrosine
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma

Remerciements

Ce projet de maîtrise n'aurait pas été possible sans l'aide, les compétences et le dévouement de nombreuses personnes dont j'ai eu l'opportunité de côtoyer durant mon parcours aux études supérieures.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Mathieu Ferron pour m'avoir permis de me joindre à son équipe afin d'effectuer ce passionnant projet de maîtrise sous sa supervision. Grâce à ses compétences scientifiques, sa rigueur, mais surtout sa passion pour la recherche, je sors grandie de cette expérience tant sur le plan professionnel que personnel.

Je tiens également à remercier particulièrement Dre Julie Lacombe de m'avoir guidée avec patience tout au long de mon cheminement. Un grand merci pour tous les conseils, l'aide et le temps accordé en rapport à l'avancement de mon projet.

Je remercie particulièrement mes collègues de laboratoire qui sont devenus des amis, Omar El Rifai, Jessica Bonneau, Catherine Julien et Dhara Patel, pour tous nos fous rires, nos discussions et votre bonne humeur. Merci de m'avoir écoutée, soutenue et aidée tout au long de ce parcours. Sans vous, je ne serais pas où je suis présentement, vous aurez toujours une place spéciale dans mon cœur.

Un grand merci au personnel des différents plateaux technologiques de l'IRCM pour votre aide au niveau technique tout au long de mon parcours. Un merci spécial à Marie-Claude Lavallée pour sa patience, son aide et sa générosité, toujours disponible pour venir en aide aux étudiants dans leur projet.

Je voudrais aussi remercier le Dr Jean-François Côté pour sa patience, ses conseils et son écoute. Tes encouragements m'ont aidé à persévérer dans la recherche et à mener à terme ce projet. Merci également aux membres du jury, Dre Louise Larose et Dr Christian Deschepper, d'avoir accepté de prendre de votre temps afin d'évaluer ce mémoire.

Je tiens aussi à remercier le Centre de Recherche du Diabète de Montréal, l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal et la Faculté des études supérieures et postdoctorales de

l'Université de Montréal pour leur soutien financier durant mon parcours aux études supérieures.

En terminant, merci aux personnes les plus importantes dans ma vie, ma famille et mes meilleures amies. Merci à mes parents qui, depuis toujours, m'encouragent et me soutiennent dans tous mes (nombreux) projets. Sans eux, je ne serais pas la femme que je suis présentement, je n'aurais pu profiter pleinement de toutes les expériences extraordinaires que j'ai eu la chance de vivre. Merci à mes amies de longue date, Cath, Claudie, Cathe, Isa et Fanny, d'être celles que vous êtes, pour vos encouragements et vos judicieux conseils. Je suis très choyée de vous compter dans ma vie.

Chapitre 1. Introduction

1.1 Le diabète

Le diabète est une maladie chronique considérée maintenant comme une épidémie selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), puisque nous ne le retrouvons plus seulement dans les pays industrialisés, mais aussi dans les pays en voie de développement et les pays sous-développés. Chaque année, il y a une augmentation constante du nombre de cas de diabète et de la prévalence de la maladie. Selon Statistiques Canada, la prévalence du diabète au Canada est estimée à 9,3% (3,4 millions) en 2015, et pourrait atteindre plus de 12,1% (5 millions) d'individus en 2025, une augmentation de 44% [1]. Jusqu'à maintenant, aucun traitement ne peut guérir cette maladie métabolique, cependant elle peut toutefois être contrôlée.

Le diabète est une maladie chronique qui se développe de façon progressive. L'incapacité à produire ou utiliser adéquatement l'insuline, hormone produite par le pancréas, est à l'origine de ce désordre métabolique, causant ainsi une accumulation de glucose dans le sang, ou hyperglycémie. De ce fait, le diabète est diagnostiqué en mesurant les niveaux de glucose dans le sang (glycémie) à jeun et suite à la prise orale de glucose. Chez un individu sain, il y aura une glycémie en dessous de 6,1 mmol/L à jeun et en dessous de 7,8 mmol/L suite à une prise orale de glucose. Le stade prédiabétique peut être observé lorsque le glucose sanguin à jeun se trouve entre 6,1 mmol/L et 7,0 mmol/L (hyperglycémie) et lorsque le glucose sanguin 2 heures suivant la prise orale est entre 7,8 et 11,0 mmol/L (intolérance au glucose). Chez un diabétique, le taux de glucose se trouve au-dessus de 7,0 mmol/L à jeun, augmentant à plus de 11,0 mmol/L suivant le test oral (Tableau I) [2].

Il existe trois grands types de diabète, soit le diabète de type 1 (DT1), de type 2 (DT2) et le diabète gestationnel. Le DT1 est aussi appelé diabète insulino-dépendant et est présent chez environ 10% des diabétiques. C'est une maladie auto-immune produite lorsque le système immunitaire de l'organisme détruit les cellules β pancréatiques, qui sont les cellules productrices d'insuline, causant une incapacité à produire de l'insuline [3]. D'autre part, chez les diabétiques de type 2, il y a production insuffisante d'insuline par les cellules bêta (β) face à une résistance tissulaire à l'insuline. Le DT2 touche plus de 90% des personnes diabétiques, en faisant ainsi la forme la plus courante [1]. Enfin, le diabète de grossesse est dû soit à une résistance des cellules à l'insuline, ou à une production insuffisante d'insuline par le pancréas. Il se caractérise par une

intolérance au glucose qui apparaît pour la première fois pendant la grossesse et disparaît généralement après celle-ci. Il est cependant important de mentionner que le diabète gestationnel prédispose au DT2 [4].

Tableau I. Critères de diagnostic de l'hyperglycémie et du diabète selon l'Organisation Mondiale de la Santé

Diagnostic	Glycémie (mmol/L)	
	À jeun	2 heures suivant la prise orale
<i>Normoglycémie</i>	<6,1	<7,8
<i>Hyperglycémie</i>	6,1 à 7,0	<7,8
<i>Intolérance au glucose</i>	<7,0	7,8 à 11,1
<i>Diabète de type 2</i>	≥7,0	≥11,1

Les symptômes observés chez les diabétiques résultent d'une glycémie plus élevée que les valeurs normales, soit une hyperglycémie. Entre autres, on peut remarquer une augmentation de l'excrétion d'urine (polyurie), une soif intense (polydipsie), une faim excessive, une perte de poids, une altération de la vision, de la fatigue et une sensation de picotements aux doigts et aux pieds. Cependant, il est important de savoir que les gens pré-diabétiques sont souvent asymptomatiques [5].

Le diabète peut mener à des complications au niveau de la santé de l'individu. En effet, avoir des niveaux trop élevés de sucre dans le sang peut avoir des effets dommageables sur plusieurs organes du corps, notamment les reins, les yeux, le système neurologique, le cœur, les vaisseaux sanguins et les os [6].

Les diabétiques sont plus susceptibles de développer des maladies cardiovasculaires, dont les complications peuvent être mortelles, comme une crise cardiaque et un accident vasculaire cérébral. Également, des corps cétoniques peuvent être libérés dans le sang lorsque l'organisme doit puiser son énergie dans les réserves de graisse dû aux faibles taux d'insuline, menant ainsi à une acidocétose. Cela peut entraîner de la confusion, des nausées, une soif excessive et une fatigue, et éventuellement évoluer vers le coma et la mort [7].

Le pied diabétique est une autre complication du diabète, qui est dû à l'apparition de lésions aux fibres nerveuses périphériques (appelé neuropathie périphérique). Le pied diabétique est caractérisé par l'apparition d'ulcère qui peut mener, lorsque combiné à une mauvaise circulation sanguine et à la présence d'infection, à la gangrène et éventuellement l'amputation. Parmi toutes les amputations des membres inférieurs, 40 à 70% sont liées au diabète [7].

Au cours de leur vie, jusqu'à 50% des diabétiques seront affectés par la néphropathie, une complication au niveau des reins, qui peut évoluer vers une insuffisance rénale chronique. Le rein est un organe vital pour l'organisme; sa fonction est de maintenir l'homéostasie du sang. Il permet d'éliminer par filtration les produits qui sont en excès dans le sang via l'urine, par exemple le sodium, le potassium, l'eau et même le glucose (qui est en excès dans le sang lors d'une hyperglycémie). Lors d'un mauvais contrôle de la glycémie, les reins doivent alors travailler plus afin d'éliminer le sucre en excès, ce qui peut mener à une altération irréversible de la fonction du rein. Le diabète est la première cause d'insuffisance rénale dans les pays développés et la néphropathie diabétique représente environ 35 à 40% des nouveaux cas d'insuffisance rénale terminale chaque année [7, 8]. Enfin, de façon inquiétante, en plus du grand nombre de complications dues au diabète, des études épidémiologiques ont montré que les individus atteints du diabète ont deux fois plus de risque de mourir prématurément que les individus non diabétiques [9].

Le diabète est une maladie incurable jusqu'à ce jour, les traitements proposés ont pour objectif de maintenir la glycémie à un niveau proche de la normale. Pour le DT1, des injections d'insuline plusieurs fois par jour sont nécessaires, combinées avec un régime alimentaire calculé et de l'activité physique. En ce qui concerne le DT2, il existe des méthodes de prévention afin d'éviter ou de retarder le développement de complications, qui visent à adopter de saines habitudes de vie afin de maintenir une glycémie à un niveau normal.

1.1.1 Le diabète de type 2

Autrefois appelé le diabète de l'âge mûr, puisqu'il était retrouvé généralement chez les personnes âgées de plus de 40 ans, le DT2 touche les gens de plus en plus jeunes. Cette pathologie est le résultat d'une combinaison entre une résistance à l'insuline dans les tissus

périphériques insulino-sensibles (muscle, tissus adipeux, foie) et une incapacité du pancréas à sécréter suffisamment d'insuline pour soutenir cette résistance. Une des principales causes du développement du DT2 est le mode de vie d'aujourd'hui, où la sédentarité et la malnutrition sont prédominantes. En effet, des études cliniques ont démontré l'efficacité de l'assainissement des habitudes nutritionnelles et de l'augmentation de l'activité physique afin de ralentir le développement du DT2 [10]. Le DT2 se développe suivant plusieurs étapes, en passant par un stade dit prédiabétique. Schématiquement, l'installation d'une résistance à l'insuline dans les tissus périphériques entraîne un stade d'hyperinsulinémie compensatoire, suivie d'une diminution progressive de la sécrétion d'insuline. Cette production inadéquate d'insuline, combinée à la résistance à l'insuline des tissus périphériques, empêche alors les cellules de capter suffisamment de glucose en circulation dans le sang, d'où l'élévation de la glycémie. L'exposition des cellules β à des niveaux élevés de glucose entraîne éventuellement une perte de fonction de ces cellules, ce qui empêche l'organisme d'avoir suffisamment d'insuline pour compenser l'hyperglycémie chronique. Il y aura alors développement d'une intolérance au glucose et éventuellement du DT2 (Figure 1) [2, 11].

1.1.1.1 Facteurs de risque

Deux principaux facteurs augmentent les risques de développer le DT2 : la génétique et l'environnement.

La majorité des cas de DT2 sont polygéniques, causés par l'interaction entre certains gènes de susceptibilité et des facteurs environnementaux. Cependant, il existe des formes de DT2 qui sont héréditaires et monogéniques : lorsqu'un membre de la famille rapprochée est atteint de cette maladie, les chances de développer le DT2 augmentent de 2 à 6 fois [12]. Ces formes de diabète sont causées par diverses mutations dans un peu plus de 20 gènes liés au DT2 affectent la production d'insuline par les cellules β pancréatiques [11]. On y retrouve des mutations qui inhibent la sécrétion d'insuline dû à une perte de dépolarisation de la membrane plasmique (sous-unité du canal potassique ATP-dépendant) ou qui causent des retards au niveau du développement du pancréas (ex. PDX1, pour *pancreatic and duodenal homeobox 1*) (Bonnefond et al, 2010). Une autre forme particulière de diabète monogénique est le MODY

(*maturity-onset of the young*) ou diabète de type adulte chez le jeune, qui est le résultat de mutations dans au moins 6 gènes, soit les gènes MODY 1 à 6 [13]. Le nom MODY vient du fait que ce diabète d'hérédité autosomique dominant se manifeste avant l'âge de 25 ans, principalement chez l'enfant ou l'adolescent. Néanmoins, l'ensemble des gènes liés au DT2 récemment découverts n'expliquent pas plus que 10% de la susceptibilité génétique liée à cette maladie [14].

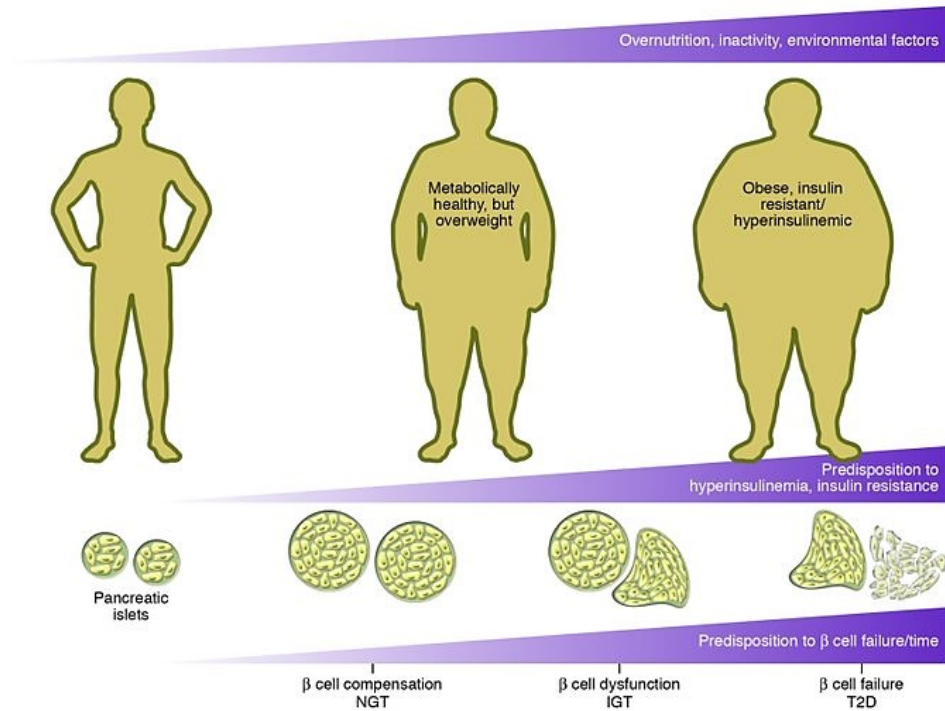


Figure 1. Développement du diabète de type 2

Le DT2 associé à l'obésité se développe en réponse à une malnutrition et un manque d'activité physique, associés à des facteurs génétiques et environnementaux. Afin de compenser la résistance à l'insuline qui s'installe, les cellules β vont proliférer et sécréter plus d'insuline. Une hyperglycémie s'installe, entraînant éventuellement une perte de fonction progressive des cellules β . Il y a alors développement d'une intolérance au glucose et éventuellement du DT2 [11].

Les principaux facteurs environnementaux ayant un impact sur le développement du DT2 sont liés au style de vie moderne, où l'on retrouve une surconsommation alimentaire et une

sédentarité accrue [15]. Un déséquilibre entre la consommation de calories et la dépense énergétique apporte une surcharge pondérale et un risque d'obésité, qui a une forte association avec le développement du DT2 [16]. D'ailleurs, plus de 70% des personnes souffrant de DT2 sont aussi obèses [17]. De ce fait, le DT2 associé à l'obésité est la forme la plus commune, le lien principal entre le DT2 et l'obésité étant la résistance à l'insuline.

L'obésité, définie par une accumulation anormale ou excessive de tissus adipeux, est reconnue comme une maladie depuis 1997 par l'OMS. De façon inquiétante, on compte un plus grand nombre de gens affectés par l'obésité et le surpoids que par la malnutrition et d'insuffisance pondérale à travers le monde. En 2014, le nombre d'adultes en surpoids était évalué à plus de 1,9 milliard, dont 600 millions étaient obèses [18]. Il y a plusieurs stades d'obésité définis selon l'indice de masse corporelle (IMC), qui tient compte de la masse grasseuse et de la taille de l'individu. Une personne ayant un IMC égal ou supérieur à 25 kg/m² est considérée comme ayant un surplus de poids, tandis qu'un IMC égal ou supérieur à 30 kg/m² est attribuable à une personne obèse [19]. Lorsque la dépense énergétique est insuffisante pour compenser un apport calorique excessif, il y a accumulation de lipides dans les adipocytes (hypertrophie), causant une augmentation de la taille des adipocytes, et ainsi du tissu adipeux. Lorsque ces cellules adipeuses sont saturées en lipides, il y aura prolifération et/ou différenciation des préadipocytes (hyperplasie) [20]. L'expansion du tissu adipeux entraîne une augmentation de la circulation des acides gras libres vers les tissus tels le foie, le muscle et le pancréas, afin de stocker le surplus d'énergie sous forme de tryacylglycérols, ce qui peut mener au développement de la résistance à l'insuline dans les tissus périphériques. En effet, ces concentrations élevées d'acides gras stimulent la gluconéogenèse dans le foie et inhibent la captation du glucose dans le foie et le muscle, contribuant ainsi à l'augmentation de la glycémie [21, 22]. Conjointement, cette forte concentration de glucose sanguin et d'acides gras devient toxique pour les cellules β ; on parle alors de « glucolipotoxicité » [23].

Cependant, l'obésité est une maladie beaucoup plus complexe, qui peut être causée par d'autres facteurs, incluant l'hérédité, l'environnement social (stress, problèmes psychologiques, anxiété) et les facteurs économiques (urbanisation, éducation) [24].

1.1.1.2 La résistance à l'insuline

L'action de l'insuline sur les tissus périphériques, tels le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux, permet la régulation de la glycémie sanguine. La résistance à l'insuline est définie comme la désensibilisation de ces tissus à l'insuline. En d'autres mots, l'insuline n'est plus capable de faire entrer le glucose dans les tissus sensibles à l'insuline et d'inhiber la production de glucose par le foie. Afin de compenser cette perte de sensibilité à l'insuline, les cellules β du pancréas vont produire et sécréter une plus grande quantité d'insuline afin de maintenir l'homéostasie glycémique. Donc, cet excès d'insuline crée une hyperinsulinémie permettant ainsi de prévenir une hyperglycémie. Cette phase dite de « compensation », où il y a augmentation de la masse et de la fonction physiologique des cellules β , peut suffire à maintenir la glycémie durant quelques années. C'est lorsque les cellules pancréatiques sont épuisées et qu'ainsi l'équilibre entre la sensibilité à l'insuline et la sécrétion d'insuline est rompue que l'homéostasie glycémique n'est plus régulée. Lors de cette phase dite de « décompensation », il y aura alors intolérance au glucose et ainsi développement du DT2. Donc, la résistance à l'insuline est une composante importante du développement du DT2, mais les facteurs déterminants de la maladie sont la perte de masse et de fonction des cellules β [25].

1.2 Le rôle de l'insuline dans l'homéostasie du glucose

Le glucose est une molécule essentielle au fonctionnement cellulaire puisqu'elle constitue sa principale source d'énergie. Malgré l'apport et la dépense énergétique variable dans une journée, la glycémie ne varie que légèrement, demeurant aux environs de 5 mmol/L. Deux mécanismes permettent de réguler cet équilibre glycémique : la sensibilité à l'insuline, qui consiste en la capacité des tissus périphériques de répondre à l'insuline, et la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas en réponse à la concentration de glucose sanguin. Lorsqu'un individu a une glycémie inférieure à 3,6 mmol/L, il est considéré comme étant en hypoglycémie, et inversement, lorsqu'elle est supérieure à 6,1 mmol/L, la personne est en hyperglycémie. Cette hyperglycémie peut être causée par une résistance à l'insuline, alors les tissus périphériques n'arrivent pas à répondre à l'insuline efficacement, ou à une dysfonction des cellules β , qui résulte en une sécrétion insuffisante d'insuline. Ces états d'hypo- et d'hyperglycémie sont

néfastes pour le corps humain. Afin de maintenir la glycémie, l'homéostasie glucidique est soumise à une régulation très fine, impliquant deux principales hormones qui sont sécrétées par le pancréas : le glucagon et l'insuline.

Le glucagon est une hormone hyperglycémiant produite par les cellules alpha (α) des îlots de Langerhans du pancréas, elle agit en situation de jeûne afin d'augmenter les niveaux de glucose dans le sang. Lorsque la glycémie est basse, le glucagon sera sécrété par le pancréas et favorisera la libération de glucose par le foie. Cette hormone agit sur la glycogénolyse en activant la dégradation du glycogène qui est en réserve et sur la néoglucogenèse en induisant la synthèse de glucose à partir d'acides aminés et d'acides gras. Il y aura alors libération du glucose dans le sang afin de rétablir la glycémie [26].

L'insuline est la seule hormone hypoglycémiant et est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Son rôle majeur est de diminuer la glycémie en induisant la captation du glucose par le muscle et le tissu adipeux et en inhibant la production hépatique du glucose. La sécrétion d'insuline est stimulée par une augmentation de la glycémie, le glucose étant le régulateur le plus important, mais aussi par l'augmentation des acides aminés et des acides gras, ainsi que sous l'influence des incrétines, par exemple GLP-1 [11]. Les niveaux élevés d'insuline dans le sang vont alors favoriser le transport du glucose et d'autres nutriments en excès (acides aminés et acides gras) vers les tissus insulino-sensibles, permettant ainsi le stockage du glucose sous forme de glycogène au niveau du muscle et du foie et sous forme de gras au niveau du tissu adipeux. De plus, l'insuline agit au niveau du foie afin d'inhiber la production et la libération hépatique de glucose [26].

1.2.1 La sécrétion de l'insuline

L'insuline est un peptide de 51 acides aminés synthétisés par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Elle est composée d'une chaîne α de 21 acides aminés et d'une chaîne β de 30 acides aminés, qui sont reliées ensemble par des ponts disulfures. L'insuline est d'abord produite sous forme de pré-pro-insuline via la traduction des ARN messager (ARNm) de l'insuline. Le peptide signal d'environ 25 acides aminés en N-terminal permet l'entrée du polypeptide dans le réticulum endoplasmique, où des enzymes protéolytiques clivent la

séquence signal, formant ainsi la pro-insuline. La pro-insuline est alors transportée dans des microvésicules vers l'appareil de Golgi des cellules β , où elle est emmagasinée dans des granules de sécrétion, qui seront libérées seulement en réponse à un signal, par exemple une augmentation de la glycémie, des acides aminés et/ou des acides gras dans la circulation sanguine. Suite au bourgeonnement des granules du transGolgi, la pro-insuline est clivée par les proprotéines convertases 2 et 3 (PC2 et PC3) et une carboxypeptidase : on obtient alors un petit peptide, le peptide C, et l'insuline mature qui pourra être sécrétée (Figure 2) [27-29].

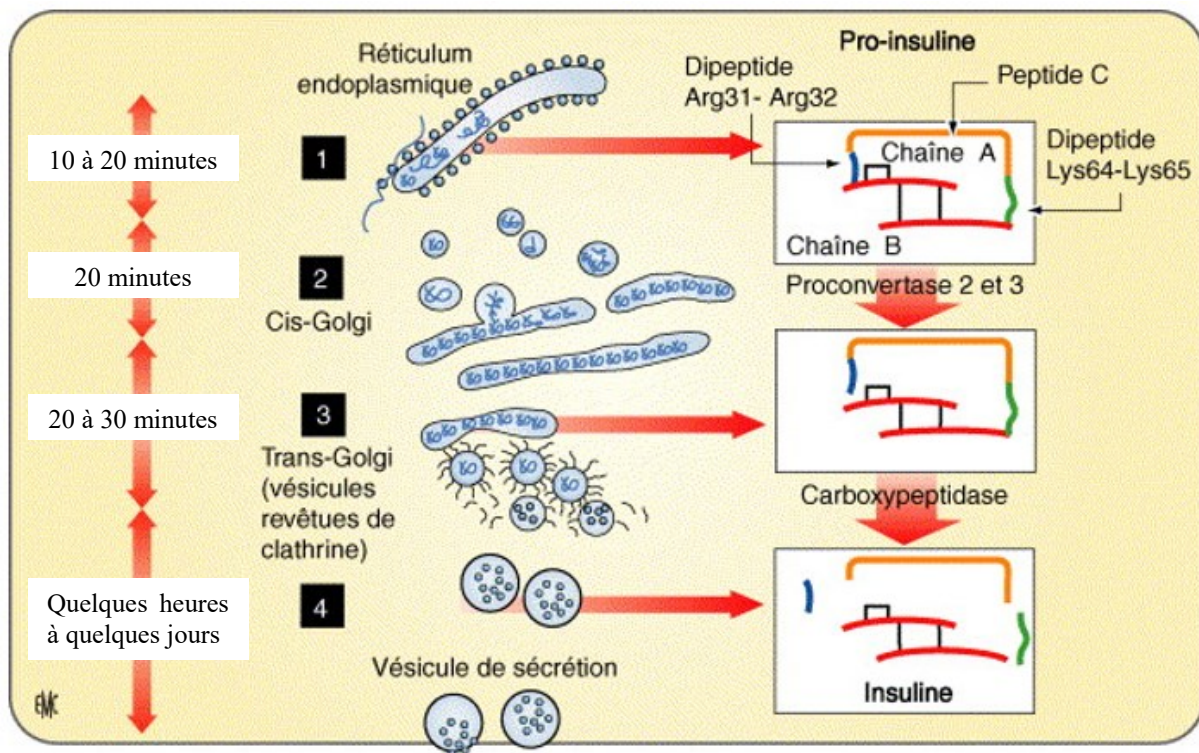


Figure 2. Formation de l'insuline et maturation des granules

1) Dans le réticulum endoplasmique, la prépro insuline produite perd son peptide signal par clivage enzymatique, donnant la pro-insuline. 2) Via des vésicules intermédiaires, la pro-insuline migre vers le cisGolgi. 3) La maturation de l'insuline se produit dans le Golgi et les vésicules issues du transGolgi, à l'aide de clivage enzymatique par PC2 et 3, et une carboxypeptidase. 4) L'insuline est emmagasinée dans des vésicules de sécrétion et migre vers la membrane cellulaire [29].

Ces granules de sécrétion sont divisées en deux bassins distincts : le bassin immédiatement mobilisable (*readily releasable pool*, RRP) et le bassin de réserve (*reserve pool*, RP). Le RP contient 99% des granules de sécrétion, et se positionne de façon plus éloignée de la membrane dans le cytoplasme, associé à des microfilaments et des microtubules du cytosquelette. Quant au RRP, il contient environ 1% des vésicules, qui sont associées à la membrane, afin d'être rapidement fusionnées suite à un stimulus, permettant la libération rapide de l'insuline [30].

La sécrétion de l'insuline en réponse à un stimulus, par exemple l'augmentation de la glycémie, est rapide et biphasique. La première phase de sécrétion de l'insuline se fait de façon immédiate et intense : les granules du RRP accolées à la membrane permettent la fusion rapide des vésicules et la libération d'une grande quantité d'insuline dans la circulation en l'espace de quelques minutes. Pour ce faire, le glucose entre dans les cellules β par le transporteur de glucose GLUT2 se retrouvant à la surface des cellules. Le glucose est alors phosphorylé en glucose-6-phosphate par la glucokinase et métabolisé à travers la voie de la glycolyse et la respiration oxydative afin de produire de l'adénosine triphosphate (ATP). Cette augmentation d'ATP inactive les canaux potassiques ATP-dépendant, entraînant une dépolarisation de la membrane plasmique et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant. Il y a alors augmentation massive de la concentration cytosolique de Ca^{2+} , ce qui stimule l'exocytose des granules de sécrétion du RRP et la libération extracellulaire de l'insuline qui y est contenue. Ce mécanisme est aussi nommé « mécanisme de déclenchement de la sécrétion de l'insuline » [29, 31].

La deuxième phase de sécrétion de l'insuline s'amorce environ 2 minutes après le stimulus, mais on l'observe seulement au bout de 10 minutes. Cette réponse est plus lente puisque les granules impliquées, soit les granules du RP, sont plus éloignées de la membrane, mais elle est aussi plus soutenue puisque ce bassin contient plus de granules. De cette façon, la quantité d'insuline libérée durant cette deuxième phase est plus grande que lors de la première phase [31]. Le mécanisme associé à la deuxième phase est nommé « mécanisme d'amplification » : ce mécanisme se fait de façon indépendante des canaux potassiques dépendants de l'ATP, mais nécessite une concentration de calcium permissive [32].

1.2.2 La signalisation de l'insuline

Le rôle majeur de l'insuline est de maintenir l'homéostasie du glucose en induisant la captation du glucose par le muscle et le tissu adipeux et en inhibant la production hépatique du glucose. De façon plus large, l'insuline est aussi impliquée dans le métabolisme des lipides et des protéines, ainsi qu'au niveau de la croissance, le développement et la mort cellulaire.

Après la sécrétion de l'insuline due à un stimulus, par exemple le glucose, l'insuline se lie à son récepteur, une protéine transmembranaire faisant partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Le récepteur de l'insuline (IR pour *insulin receptor*) est présent à la surface de toutes les cellules de l'organisme, mais il est exprimé surtout dans les cellules du tissu adipeux, les cellules musculaires et les cellules hépatiques; on le retrouve sous forme d'hétérodimère dans la membrane. Au niveau de la structure, il est formé de deux chaînes α extracellulaires, contenant un site de liaison à l'insuline, reliées par des ponts disulfures à deux chaînes β transmembranaires, où l'on retrouve le domaine catalytique tyrosine kinase (TK) [33]. En l'absence d'insuline, une boucle de régulation sur les sous-unités β bloque leur site catalytique TK, maintenant le récepteur de l'insuline inactif. La liaison de l'insuline au IR augmente la stabilité du dimère, rapprochant les domaines kinases qui permet ainsi la transphosphorylation des résidus tyrosines (Y1146, Y1150 et Y1151) des chaînes β , rendant le récepteur actif [34]. La phosphorylation de la tyrosine 960 de la chaîne β du récepteur de l'insuline permet la liaison des IRS (*insulin receptor substrate*), protéines substrats du récepteur de l'insuline, via leur domaine PTB (*phosphotyrosin binding*). Jusqu'à maintenant, quatre membres de la famille des IRS ont été identifiés, IRS 1 à 4. IRS1 et IRS2 sont exprimés ubiquitairement et sont les médiateurs primaires de la réponse insulino-dépendante et de la régulation du métabolisme du glucose dans la plupart des types cellulaires. Dans le muscle et le tissu adipeux, IRS1 a un rôle prédominant dans l'induction du transport de glucose. IRS2 pour sa part serait plutôt impliqué dans la réponse à l'insuline des hépatocytes et dans la survie des cellules β . On retrouve un autre substrat chez l'homme, soit IRS4, qui est exprimé dans le cerveau, les reins, le thymus et le foie. IRS3, le quatrième membre de la famille des IRS, est retrouvé chez les rongeurs dans le tissu adipeux, les fibroblastes et le foie, tandis qu'IRS4 n'a été observé que dans des cultures cellulaires provenant de rein embryonnaire [35].

Ces protéines substrats sont localisées à la membrane plasmique sur la face cytosolique via l'interaction de leur domaine PH (*Pleckstrin homology*), leur permettant de positionner leur domaine PTB en face de la tyrosine 960 phosphorylée du récepteur de l'insuline [36]. Les IRS phosphorylés servent alors de protéines de liaison pour d'autres protéines de la signalisation. Les complexes ainsi créés peuvent initier l'activation de différentes voies de signalisation, dont les deux principales sont la voie Ras-MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) et la voie PI3K-AKT (*phosphatidylinositol 3-kinase*). Comme son nom l'indique, l'activation de la signalisation Ras-MAPK par l'insuline favorise la mitose ainsi que la croissance cellulaire. De l'autre côté, la signalisation PI3K-AKT affecte la synthèse des protéines et des lipides, la survie cellulaire et l'apoptose, la régulation du glycogène via GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*), ainsi que la translocation insulino-stimulée du transporteur de glucose GLUT4 (*glucose transporter 4*) [37].

1.2.2.1 La voie PI3K-AKT

La PI3K contient un domaine SH2 (*Src homology 2*) qui reconnaît les résidus tyrosines phosphorylés des IRS, permettant la localisation de PI3K à la membrane et sa phosphorylation. Ainsi activée, PI3K peut induire la conversion du lipide membranaire phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) grâce à l'ajout d'un groupement phosphate [36, 38]. Ainsi, le PIP3 agit comme un second messager, permettant le recrutement à la membrane de la protéine kinase AKT via son domaine PH, qui ainsi positionnée pourra être phosphorylée au site T308 (T *pour* thréonine) par les protéines kinase-1 et -2 dépendantes du phosphatidyl-inositol (PDK1/2) [38, 39]. De plus, AKT est phosphorylé sur la S473 (S pour sérine) par la protéine sérine/thréonine kinase mTOR (pour *mammalian target of rapamycin*) du complexe mTORC2 en réponse à l'insuline [40]. Ainsi activée, la kinase AKT peut phosphoryler des protéines qui régulent plusieurs réponses, par exemple la synthèse des lipides, du glycogène et des protéines ainsi que l'homéostasie du glucose via la translocation de GLUT4 [38].

Par exemple, la phosphorylation d'AKT entraîne la phosphorylation du facteur de transcription FOXO1 (*Forkhead box protein O1*). Lorsque FOXO1 est non phosphorylé, il est

localisé dans le noyau et se lie au promoteur de l'enzyme glucose-6-phosphatase. Cette liaison au promoteur permet d'augmenter la vitesse de transcription de l'enzyme et ainsi d'augmenter la vitesse de production du glucose hépatique. La phosphorylation de FOXO1 par AKT induit l'exclusion du noyau du facteur de transcription, ce qui inhibe son activité transcriptionnelle et ainsi diminue la production de glucose hépatique [41].

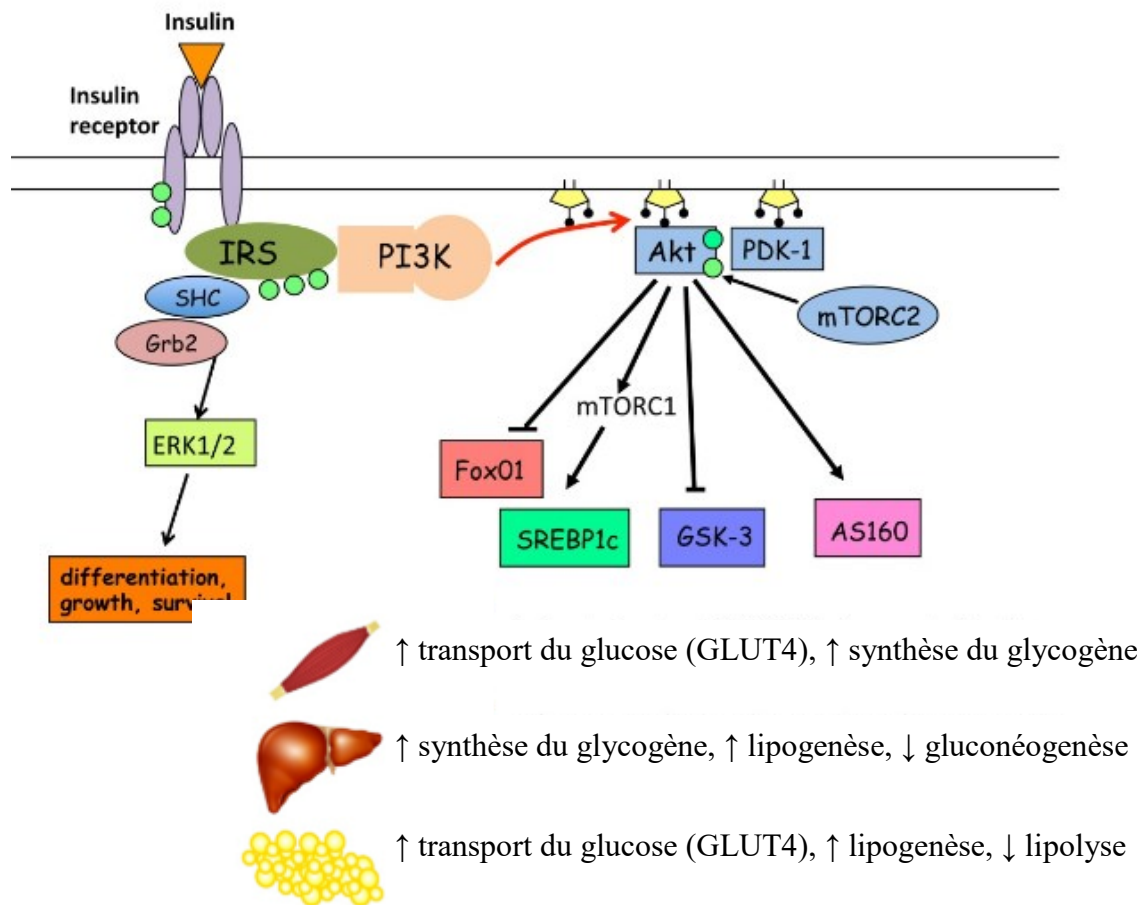


Figure 3. Voie de signalisation de l'insuline.

L'insuline se lie à son récepteur, ce qui induit l'initiation d'un processus de signalisation impliquant plusieurs voies où l'on retrouve événements de phosphorylation multiples (cercles verts), conduisant entre autres à des altérations du métabolisme du glucose et des lipides (Adapté de [42]).

De plus, suite à son activation, AKT phosphoryle l'enzyme GSK3 et diminue son activité envers la glycogène synthase. Donc, l'inactivation de GSK3 par AKT conduit à l'accumulation et au stockage du glucose sous forme de glycogène (glycogénèse). Également, l'inactivation de GSK3 conduit à la déphosphorylation de facteurs de transcription et de facteurs d'initiation de la traduction, favorisant ainsi la synthèse protéique et le stockage d'acides aminés [38].

L'action de l'insuline est régulée par la balance entre la phosphorylation et la déphosphorylation de PIP2 et PIP3. En effet, la phosphatase PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) est un antagoniste de la voie PI3K-AKT, elle déphosphoryle PIP3 en PIP2 [38]. Également, GSK3 permet la phosphorylation d'IRS1 et IRS2 sur sérine et thréonine, prévenant leur phosphorylation sur tyrosine par le récepteur de l'insuline, créant une rétroaction négative qui permet d'inhiber la voie de l'insuline [43]. D'autres facteurs impliqués dans la résistance à l'insuline peuvent activer la phosphorylation des résidus sérine/thréonine, comme un hyperinsulinisme, le TNF α (*tumornecrosis factor α*) ou les acides gras libres libérés en excès par le tissu adipeux et transformés dans la cellule en acetylCoA (*acyl coenzyme A*).

1.2.2.2 La régulation du taux de glucose via les transporteurs de glucose

Le transport du glucose dans l'organisme se fait via des protéines membranaires nommées les transporteurs GLUT (GLUT pour glucose transporter). Parmi les 14 isoformes GLUT que l'on retrouve chez l'humain, 11 ont été identifiés comme des transporteurs de glucose, utilisant entre autres le glucose comme substrat, les autres substrats pouvant être le fructose, le myo-inositol et l'urate. Selon leur fonction biologique, on retrouve les transporteurs GLUT dans différents tissus et leur affinité respective pour le glucose est variable [44]. Par exemple, GLUT4 est dépendant de l'insuline, c'est pourquoi on le retrouve dans les insulino-sensibles comme les tissus adipeux et les muscles afin de contrôler l'utilisation de glucose par ces tissus [44].

Le transporteur GLUT1 est exprimé de façon ubiquitaire, c'est-à-dire qu'il est présent dans tous les types cellulaires, afin de réguler le transport basal du glucose. GLUT3 a une plus grande affinité et une capacité de transport du glucose plus élevée que GLUT1,2 et 4, c'est pourquoi il est exprimé dans les tissus nécessitant de grandes quantités de glucose comme le

cerveau [45]. Dans les cellules β pancréatiques, c'est le transporteur GLUT2 qui assure le transport de glucose en réponse à l'insuline, afin de réguler l'homéostasie glucidique. Malgré sa faible affinité pour le glucose par rapport aux autres transporteurs, l'efficacité de GLUT2 dépend uniquement de la concentration de glucose sanguine, contrairement à d'autres GLUT, qui dépendent par exemple de la quantité de transporteurs présents à la membrane. En d'autres termes, cela permet d'avoir une réponse sans aucune saturation du transporteur. Cette caractéristique propre au GLUT2 est due à une constante de Michaelis-Menten la plus élevée pour le glucose, soit de 17 mmol/L, permettant ainsi d'obtenir une concentration intracellulaire de glucose identique à la concentration sanguine [46, 47]. GLUT2 est aussi exprimé au niveau du foie et des reins de façon moindre que dans les cellules β .

D'autre part, le transporteur GLUT4 possède une grande affinité pour le glucose, c'est pourquoi on le retrouve au niveau des tissus sensibles à l'insuline [48]. Ce transporteur est présent en faible concentration à la membrane, la majorité étant principalement localisée dans des vésicules intracellulaires. La signalisation PI3K-AKT, lorsqu'elle est activée, permet la translocation de GLUT4 présents dans les vésicules à la membrane plasmique, afin d'augmenter la concentration du transporteur au niveau de la membrane plasmique, et ainsi augmenter la quantité de glucose transporté vers les cellules [36]. Ainsi, l'insuline régule la consommation de glucose par les cellules en permettant une plus grande entrée de glucose sanguin à l'intérieur des cellules.

La translocation de GLUT4 est régulée de façon post-traductionnelle via un substrat d'AKT, soit AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*). La protéine AS160 possède une activité GTPase-activating protein (GAP) à l'endroit des membres de la famille des protéines Rab, des petites protéines G qui participent au mouvement et à la fusion de vésicules. La phosphorylation d'AS160 inhibe son activité GAP, ce qui augmente les niveaux de la forme GTP-Rab, qui est nécessaire pour la translocation de GLUT4 par vésicules [49].

1.2.2.3 La voie de signalisation mTORC1/S6K1

La protéine sérine/thréonine kinase mTOR est une des nombreuses cibles en aval d'AKT. Plusieurs pathologies sont liées à la dérégulation de cette voie, comme le cancer, le

diabète et l'obésité. Cela est dû au fait que cette kinase régule de nombreux mécanismes moléculaires qui affectent plusieurs fonctions cellulaires importantes, entre autres la croissance, la prolifération et la survie cellulaire, le métabolisme ainsi que la synthèse des protéines et des lipides [50].

La kinase mTOR est la sous-unité catalytique de deux complexes, soit mTORC1 et mTORC2, qui diffèrent par leur composition protéique, leur conférant ainsi des fonctions et des mécanismes d'activation différents. Par exemple, mTORC1 régule des mécanismes liés à l'homéostasie énergétique de la cellule, tandis que mTORC2 régule entre autres la réorganisation du cytosquelette d'actine [51, 52].

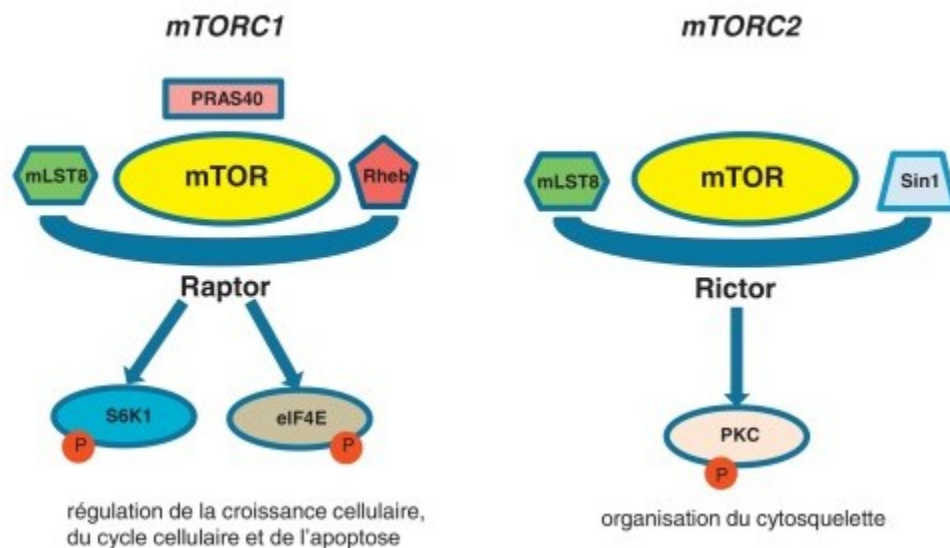


Figure 4. La protéine mTOR entre dans la composition de deux types de complexes actifs, mTORC1 et mTORC2

Les complexes mTORC1 et mTORC2 partagent la même sous-unité catalytique, soit mTOR, mais leur composition protéique différente leur confère des fonctions différentes. Par exemple, mTORC1 régule des mécanismes liés à l'homéostasie énergétique de la cellule, tandis que mTORC2 régule la réorganisation du cytosquelette [53]. (eIF4E : *eukaryotic translation initiation factor 4E* ; mLST8 : *mammalian lethal with sec-13 protein 8* ; PKC : protéine kinase C ; PRAS40 : *protein rich AKT/PKB substrate 40 kDa* ; Raptor : *regulatory-associated protein of mTOR* ; Rheb : *Ras homolog enriched in brain* ; Rictor : *rapamycin-insensitive companion of mTOR* ; S6K1 : S6 kinase 1 ; Sin1 : *stress-activated map kinase-interacting protein 1*).

Une multitude de signaux régulent l'activité du complexe mTORC1 tels que les facteurs de croissance et les hormones, les nutriments, le glucose et les niveaux d'oxygène. En réponse à l'insuline, une hormone, l'activation de PI3K entraîne la phosphorylation AKT, qui va lui-même phosphoryler TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) [54]. Cette phosphorylation va inhiber l'activité GAP du complexe que forment TSC1/2, et ainsi permettre à la protéine Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), une petite molécule ayant une activité GTPase, d'activer mTORC1 [50]. Par la suite, mTORC1 va, par phosphorylation, inactiver à son tour la protéine 4E-BP1 (*eIF4E-binding proteins1*), et activer la kinase ribosomale S6 (S6K1). Ces deux protéines régulées par mTORC1 contrôlent l'initiation de la traduction et la synthèse des ribosomes, régulant ainsi la traduction et la synthèse protéique, le cycle cellulaire et l'apoptose [55].

Spécifiquement, 4E-BP1 inhibe la synthèse protéique en séquestrant le facteur d'initiation de la transcription eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*). Donc lorsque l'insuline stimule la phosphorylation de 4E-BP1 via mTORC1, eIF4E est libre de former le complexe d'initiation sur l'ARNm [54]. Une étude chez la souris a montré que lorsque 4E-BP1 est supprimé, il y a une diminution de tissus adipeux blancs, et augmentation du métabolisme énergétique [56], ce qui montre que la voie mTORC1 peut réguler l'adipogenèse et le métabolisme énergétique via cette protéine.

De son côté, S6K1 induit la phosphorylation de la protéine ribosomale S6, ce qui entraîne une augmentation de l'initiation de la traduction d'ARNm codant pour des protéines impliquées dans la synthèse protéique et certains facteurs d'élongation [57, 58]. Des études effectuées sur des souris déficientes en *p70S6k* ont démontré une diminution de la croissance lors de l'embryogenèse [59]. De plus, il a été observé que les souris déficientes en *p70S6k* présentent une hyperinsulinémie causée par une diminution de la taille des cellules β du pancréas, entraînant une intolérance au glucose [60]. Également, S6K1 a un rôle particulier au niveau de la signalisation de l'insuline et de PI3K. En effet, il sert de régulateur au niveau d'IRS1 en le phosphorylant sur des résidus sérines, régulant son habileté à transcrire l'insuline [61].

Enfin, le complexe mTORC1 régule également la synthèse des lipides nécessaires pour la prolifération cellulaire [62]. Ce complexe active les facteurs de transcription SREBP1/2 (*sterol regulatory element binding protein 1/2*), induisant sa translocation au noyau et ainsi

l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et du cholestérol.

1.3 La vitamine K

On utilise le terme « vitamine » pour désigner les molécules organiques qui ne peuvent être synthétisées par l'organisme. Nutriment essentiel, la source principale de l'apport en vitamines est l'alimentation.

La vitamine K (VK) est une vitamine liposoluble qui a été purifiée à partir de la luzerne par le biochimiste danois Car Peter Henrik Dam (Prix Nobel avec Edward Adelbert Doisy, 1943). Cette molécule a été découverte vers la fin des années 1920, lorsque travaillant sur le rôle du cholestérol, Dam remarque qu'une hémorragie apparaît chez les poules ayant une alimentation faible en lipide. Puisque cette molécule a un effet coagulant, ce composé est appelé « vitamine de la coagulation », le K venant du terme allemand *Koagulation* [63, 64]. Plusieurs rôles ont été conférés à cette vitamine : elle favorise la synthèse de facteurs de coagulation et a un rôle dans la santé des vaisseaux sanguins, tendons, cartilages et autres tissus conjonctifs.

On peut distinguer deux formes naturelles de VK, ayant en commun un noyau 2-méthyle-1,4-naphtoquinone (ménadione). Une chaîne latérale carbonée y est attachée, et celle-ci confère aux différentes VK leurs propriétés particulières. La phylloquinone, aussi nommée VK₁, contient une chaîne latérale phytyle (comme dans la chlorophylle) et est synthétisée uniquement par les plantes [65]. Les ménaquinones (MK), ou VK₂, sont retrouvées dans les animaux et peuvent aussi être synthétisées par les bactéries de la flore intestinale. Elles sont divisées en sous-famille selon le nombre d'unités isoprène contenu sur la chaîne latérale, qui peut aller de 4 à 12 unités (MK-n) [66].

1.3.1 Sources de vitamine K

L'apport en VK chez l'homme provient majoritairement de l'alimentation. La phylloquinone est la principale source de VK, provenant principalement des légumes verts

feuillus, comme les épinards ou la laitue. On la retrouve aussi dans d'autres types de légumes, certains fruits, et dans les aliments riches en lipides, comme des huiles. Les ménaquinones font aussi partie de l'apport en VK, et elles sont retrouvées en petites quantités dans les viandes animales, les œufs, les produits laitiers et fermentés. En effet, le nattō, un aliment traditionnel japonais à base de fèves de soya fermentées par la bactérie *Bacillus natto*, est très riche en MK-7 [63, 66, 67].

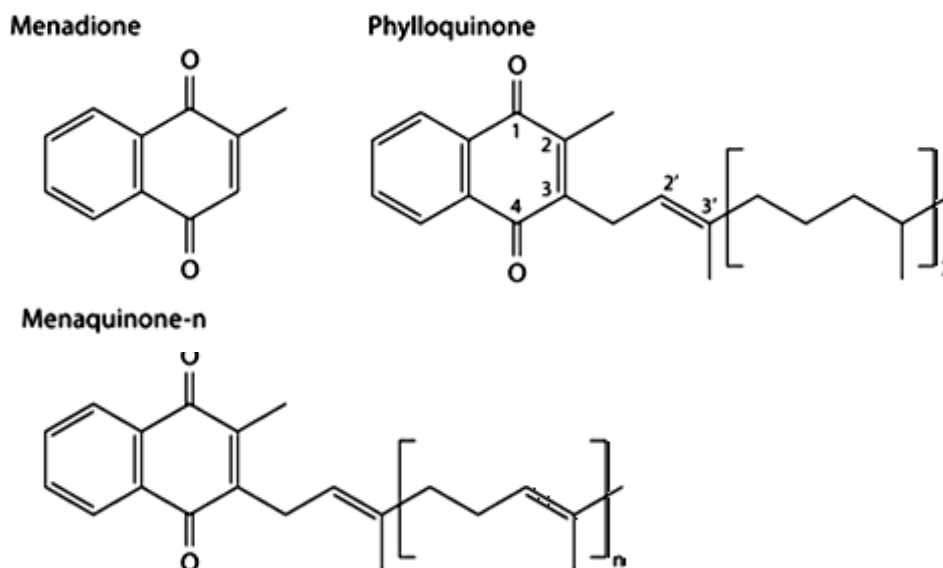


Figure 5. Structure chimique des différentes formes de vitamine K (adapté de [68]).

La VK, comme les autres vitamines liposolubles (vitamines A, D et E), est absorbée au niveau de l'intestin à l'aide des sels biliaires et sucs pancréatiques [67]. La phylloquinone (VK₁) est la principale forme de vitamine K consommée chez l'humain 90%, c'est la forme prédominante dans la circulation sanguine [63]. Cependant, la concentration de VK₁ dans les tissus est très faible comparativement aux ménaquinones, spécialement la MK-4, la forme majeure de vitamine K dans les tissus (>90%). Récemment, il a été identifié que la VK₁ est convertie en MK-4 par une enzyme nommée *UbiA prenyltransferase containing 1* (UBIAD1) [67, 69].

1.3.2 La γ -carboxylation et le cycle de la vitamine K

La vitamine K est impliquée dans la réaction enzymatique nommée gamma-glutamyl-carboxylation (γ -carboxylation), qui permet la conversion des résidus d'acide glutamique (Glu) en résidus d'acide γ -carboxyglutamique (Gla) [70]. La VK sert de cofacteur à l'enzyme impliquée dans cette modification post-traductionnelle, soit la γ -glutamyl-carboxylase (GGCX). Plus précisément, la forme réduite de la VK, l'hydroquinone, sert de cofacteur à l'enzyme GGCX, qui catalyse l'ajout d'un groupement carboxyle sur le résidu Glu, donnant ainsi un résidu Gla. La VK ainsi oxydée, nommée la vitamine K 2,3-époxyde, doit ensuite être recyclée grâce à l'enzyme vitamine K époxyde réductase (VKOR), suivant deux réactions successives : la VK oxydée est recyclée est quinone, puis en hydroquinone. La forme réduite peut alors être réutilisée pour la γ -carboxylation. Cette réaction de réduction et d'oxydation de la VK impliquant GGCX et VKOR est aussi appelée cycle de la vitamine K [71, 72]. La γ -carboxylation est inhibée par la warfarine, un anticoagulant. Ce composé agit en inhibant VKORC1, dû à sa structure similaire aux substrats de l'enzyme. Cette inhibition ralentit le cycle de la VK, puisqu'elle ne peut plus être réduite, limitant ainsi la disponibilité de l'hydroquinone nécessaire à la γ -carboxylation [73].

1.3.3 Protéines dépendantes de la vitamine K : Les protéines Gla

Les protéines qui subissent la γ -carboxylation sont dites dépendantes de la VK, on les appelle aussi protéines Gla. Jusqu'à ce jour, 14 protéines Gla ont été identifiées. Parmi ces protéines Gla, on en compte 7 qui sont impliquées dans la coagulation sanguine : la prothrombine (facteur II), les facteurs VII, IX et X, et les protéines C, S, et Z [74]. Ces protéines dépendantes de la VK contiennent de 10 à 12 résidus Gla. Il est donc bien établi que la VK joue un rôle important dans la coagulation. La découverte des autres protéines Gla a cependant élargi les fonctions biologiques connues où la VK joue un rôle important, notamment l'ostéocalcine (OCN) dans le tissu osseux, la MGP (*Matrix Gla protein*) au niveau des cartilages et vaisseaux sanguins, ainsi que la protéine GAS6 (*Growth arrest-specific gene 6*) au niveau de l'inflammation [63, 75-77]. Vu la découverte de l'importance de la VK dans des fonctions

biologiques autres que la coagulation, plusieurs études se penchent sur le rôle potentiel de la VK dans la santé osseuse, la santé cardiovasculaire, la cognition, le processus inflammatoire, la résistance à l'insuline et le cancer [78].

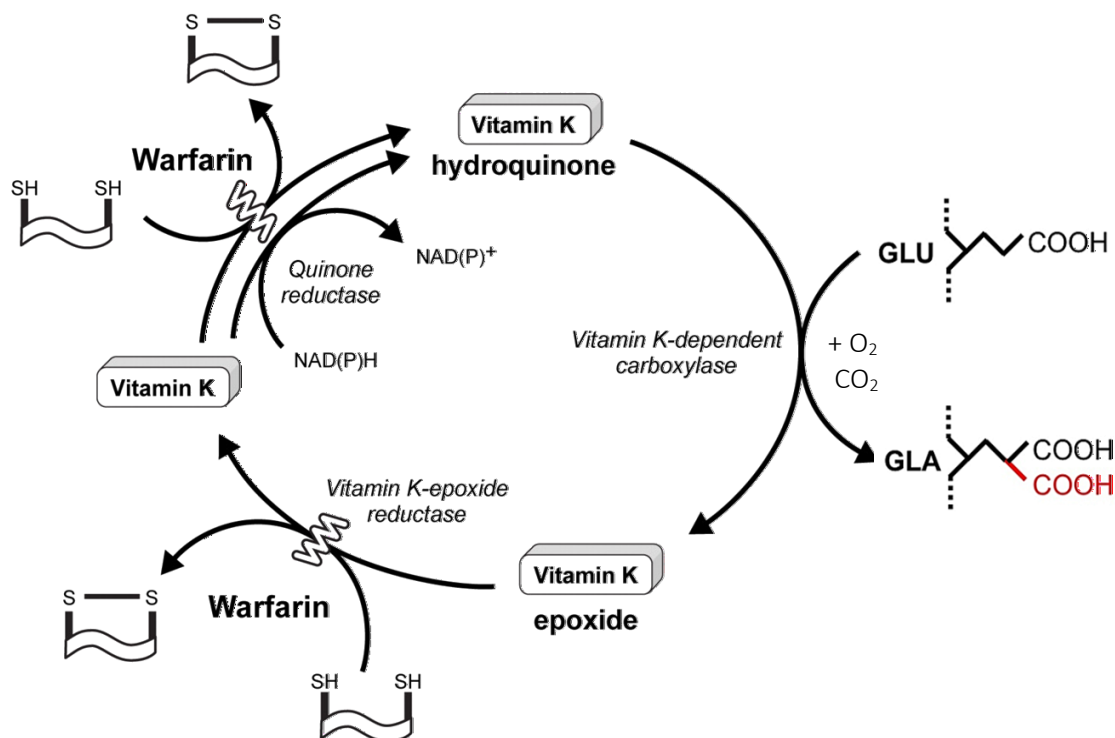


Figure 6. Gamma-carboxylation des protéines dépendantes de la vitamine K et cycle de la vitamine K (adapté de [79]).

1.3.3.1 La protéine GAS6

La protéine dépendante de la vitamine K GAS6 est un facteur de croissance découvert en 1988 comme étant exprimé dans des fibroblastes en arrêt de croissance [80]. C'est une protéine sécrétée de 75 kDa (Kilodalton, unité de masse atomique unifiée) qui partage une similarité (~40% de leur séquence d'acides aminés) avec une autre protéine Gla, la protéine S, qui est impliquée dans la coagulation. Ces deux protéines sont composées des mêmes domaines : un domaine Gla en N-terminal, où sont situés les résidus γ -carboxylés, suivi d'une boucle contenant un pont disulfure, 4 domaines de facteur de croissance épidermique (*EGF-like*) et un

domaine SHBG-like (*sex hormone-binding globulin*). C'est ce domaine qui sert à la liaison de Gas6 aux récepteurs tyrosine kinase de la famille TAM, induisant ainsi leur dimérisation et leur activation [81]. Fait important, la protéine S contient un domaine supplémentaire absent dans la protéine GAS6, soit un site de clivage par la thrombine.

On retrouve, chez tous les vertébrés, des gènes orthologues pour ces deux protéines, ce qui laisse penser qu'elles sont toutes deux nécessaires malgré qu'elles puissent exercer des fonctions biologiques différentes et ont ainsi des fonctions biologiques différentes. De plus, malgré leur similarité, l'expression des gènes *Gas6* et *Prosl* (gène qui encode la protéine S) dans les tissus est différente, chez la souris. En effet, comme la plupart des facteurs impliqués dans la coagulation, la protéine S est exprimée au niveau du foie, mais également au niveau des reins, des poumons et des gonades. L'expression du gène *Gas6* est différente, puisqu'il est faiblement exprimé au niveau du foie comparativement aux autres tissus [82].

Ces protéines agissent en tant que ligands pour les RTK de la famille TAM, soient TYRO3, AXL, MERTK. Leur affinité respective pour ces récepteurs est différente, ce qui apporte une autre évidence de leur fonction biologique unique. D'une part, il a été démontré que GAS6 peut servir de ligand pour les trois RTK, ayant une plus grande affinité pour AXL que pour les deux autres récepteurs. D'un autre côté, la protéine S a une affinité pour TYRO3 et MERTK, mais aucune pour AXL [83].

1.3.3.2 Récepteurs tyrosine kinase de la famille TAM

Les RTK sont des protéines transmembranaires qui partagent un domaine TK intracellulaire extrêmement conservés; on les classe en sous-familles selon leur domaine extracellulaire, où l'on retrouve une plus grande variabilité. La famille TAM contient trois récepteurs, soient TYRO3, AXL et MERTK, d'abord identifiés de façon indépendante, que l'on regroupe puisqu'ils partagent une structure similaire. Ils sont formés d'un domaine extracellulaire composé de deux domaines de type immunoglobulines (Ig) ainsi que de deux domaines de type fibronectine III (FNIII). La portion intracellulaire contient le domaine TK, où l'on retrouve une séquence contenant des motifs spécifiques à ces récepteurs dans le domaine catalytique (KW(I/L)A(I/L)ES) ainsi qu'un petit domaine en C-terminal [83]. C'est à la portion

extracellulaire que se lie le ligand, soit GAS6 (AXL>TYRO3>MERTK) ou protéine S (TYRO3>MERTK, mais pas AXL), ce qui induit une dimérisation du récepteur, permettant une transphosphorylation des récepteurs au niveau de la portion intracellulaire. Cette transphosphorylation contribue à l'augmentation de l'activité tyrosine kinase des récepteurs. De façon intéressante, une étude a suggéré que ces récepteurs peuvent former un hétérodimère entre TYRO3 et AXL dans les neurones en développement. En plus de cette activation par la liaison d'un ligand, il a été montré que certains des récepteurs TAM peuvent être activés sans la présence du ligand. Lors d'une surexpression, par exemple dans des cellules cancéreuses, la présence d'une quantité élevée de récepteurs à la membrane cellulaire peut induire une dimérisation spontanée, permettant ainsi l'augmentation du signal. Ces récepteurs ont un profil d'expression qui corrèle avec leurs fonctions biologiques respectives et peuvent activer différentes voies de signalisation, incluant les voies PI3K/AKT, Ras/MAPK, Stat3 et Rac [84, 85].

1.3.3.3 Fonctions biologiques connues de GAS6 et des récepteurs TAM

Afin d'étudier les différents rôles biologiques de ces récepteurs et de leurs ligands, des modèles animaux de perte de fonction ont été produits, soit des souris mutantes (-/-) pour les différents récepteurs, pour tous les récepteurs en même temps, ainsi que pour *Gas6* et *ProS1*. Ces études ont démontré des phénotypes différents, révélant des fonctions différentes pour les trois récepteurs TAM. Cependant, fait intéressant, toutes les souris déficientes des récepteurs TAM étudiés jusqu'à maintenant, soit celles déficientes pour les récepteurs individuellement ou même pour les trois gènes, sont viables et ne présentent aucun trouble au niveau du développement embryonnaire [86].

L'étude des souris déficientes pour les trois récepteurs a mis en évidence la nécessité de ces récepteurs pour la spermatogenèse, puisque ces souris mâles déficientes en *Tyro3*, *Axl* et *Mertk* sont infertiles, dû à une inflammation accrue et un dysfonctionnement des cellules de Sertoli [87]. Un autre rôle important pour les récepteurs TAM a été mis en évidence par l'étude phénotypique de ces souris au niveau du système immunitaire. Les souris déficientes pour *Mertk* présentent des caractéristiques de réaction auto-immunitaire, et ce phénotype est aggravé chez

les souris déficientes pour deux et trois des récepteurs. Ces études ont démontré la nécessité des récepteurs TAM pour la lyse des cellules apoptotiques non phagocytées et pour la suppression de l'inflammation induite par les récepteurs *toll-like* via l'activation de la transcription des gènes *Socs* (*suppressor of cytokine signaling*) [88]. Suite à l'étude des souris déficientes en *Tyro3* seulement, il a été mis en évidence que le rôle principal de ce récepteur est associé au système nerveux central, puisque ces souris développent avec l'âge des troubles de dégénérescence du système nerveux [89]. Les souris *Mertk*^{-/-}, quant à elles, développent une dégénérescence des photorécepteurs entre l'âge de 4 à 8 semaines, jusqu'à devenir aveugle [90]. De plus, chez l'humain, il y a une maladie génétique de dégénérescence de la rétine associée au gène *Mertk* [91]. Au niveau du gène *Axl*, les souris mutantes pour ce gène ont une perméabilité vasculaire plus élevée et montrent des problèmes au niveau du remodelage vasculaire [92]. Fait intéressant, *Axl* est surexprimé dans les tumeurs mammaires, et l'utilisation d'une molécule pharmacologique inhibant *Axl* altère l'invasion des cellules du cancer du sein, dans des modèles animaux [84, 93]. De façon importante, plusieurs études ont démontré que l'activation des récepteurs TAM via Gas6 nécessite le domaine Gla, ce qui suggère que la γ -carboxylation dépendante de la VK est requise pour que GAS6 puissent accomplir ses fonctions biologiques [94, 95].

1.3.4 La voie de signalisation en aval du récepteur AXL

Comme il a été dit précédemment, la protéine GAS6 est le seul ligand connu à ce jour du récepteur AXL. Une étude intéressante a montré que l'activation d'AXL est uniquement dépendante de GAS6, mais qu'AXL est aussi requis pour l'expression de GAS6. Par exemple, l'expression de *Gas6* dans certains tissus de souris de type sauvage (+/+) était perdue dans les souris *Axl*^{-/-}, ce qui n'était pas observé chez les souris déficientes pour les deux autres récepteurs; cela suggère donc qu'il y a une corégulation dans l'expression de ces deux protéines [96]. Plusieurs études *in vitro* ont montré l'implication de la voie de signalisation GAS6-AXL dans la survie cellulaire et la prolifération [97-99].

Pour activer son récepteur, il est suggéré que la liaison de GAS6 à AXL se fait via le domaine SHBG-like situé en C-terminal qui se lie aux Ig situés sur la portion extracellulaire du

récepteur. L'activation d'AXL par son ligand se fait en deux étapes : d'abord la formation d'un complexe 1:1 GAS6/AXL suivi de la dimérisation de ce complexe [100]. La formation de cet homodimère rapproche les sites TK intracellulaire du récepteur, permettant ainsi l'autophosphorylation des résidus tyrosines, les trois sites connus étant Y779, Y821 et Y866 (Y pour résidu tyrosine). Cette phosphorylation des différents résidus permettent la liaison d'AXL à différentes protéines, entres autres PI3K, phospholipase C (PLC), Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), C1-TEN, *NCK adaptor protein 2* (Nck2) and SOCS1 [101]. Cette liaison se fait via les phosphotyrosines, qui ont des séquences contenant des motifs spécifiques reconnus par des protéines en aval de la signalisation, via de leur domaine SH2 ou de leur domaine PTB [102].

L'activation de la voie PI3K/AKT est importante au niveau de la signalisation dépendante d'AXL. En effet, il a été montré que la voie de signalisation GAS6/AXL/PI3K/AKT protège les cellules de l'apoptose via plusieurs mécanismes, par exemple via l'activation de S6K de la voie mTOR qui phosphoryle et inhibe à son tour la protéine proapoptotique Bad (*BCL2-associated agonist of cell death*) [103].

Chapitre 2. Mise en contexte du projet

2.1 La vitamine K et le métabolisme du glucose

Les micronutriments jouent des rôles importants au niveau de plusieurs réactions métaboliques et une modulation de leur niveau physiologique peut entraîner des effets néfastes sur la santé humaine. Certaines études ont démontré un effet positif des nutriments au niveau de la prévention et du contrôle de plusieurs maladies chroniques. En effet, il a été démontré que les individus obèses ou diabétiques de type 2 ont une déficience au niveau de certains nutriments, incluant les vitamines B1, C et D [104-106]. D'autres études suggèrent un lien entre cette déficience et le risque de développement du DT2 et de maladies cardiovasculaires [107, 108]. Des études plus récentes suggèrent un rôle potentiel de la vitamine K au niveau du métabolisme du glucose, de l'obésité et du DT2.

Une étude chez le rat suggère qu'une diète faible en VK corrèle avec des niveaux faibles d'insuline sérique et une augmentation du glucose sanguin suite à un bolus de glucose [109]. Chez l'homme, une supplémentation en VK réduirait le glucose sanguin, et augmenterait la sécrétion et la sensibilité à l'insuline [110, 111]. De façon importante, plusieurs études ont montré qu'une déficience en VK corrèle avec l'augmentation de risque de diabète, d'obésité et de résistance à l'insuline. De plus, la VK étant un nutriment liposoluble, une étude suggère qu'elle s'accumule à de grandes concentrations dans le tissu adipeux et qu'un haut pourcentage en gras corrèle avec une diminution de la γ -carboxylation de la prothrombine [112]. Malgré les études effectuées afin de connaître le rôle de la VK sur le métabolisme du glucose, les mécanismes impliqués sont toujours inconnus.

De ce fait, un des intérêts du laboratoire du Dr Ferron, mon directeur de recherche, est de mieux caractériser ces nouvelles fonctions de la vitamine K dans le métabolisme énergétique et d'identifier les protéines γ -carboxylées impliquées. En particulier, nous sommes intéressés par le rôle potentiel de la vitamine K et de la γ -carboxylation dans le métabolisme du glucose et dans la résistance à l'insuline.

Récemment, des études effectuées par le Dr. Ferron portant sur l'ostéocalcine ont permis de mettre en évidence pour la première fois le rôle d'une protéine Gla dans le contrôle du métabolisme du glucose. L'OCN est une protéine sécrétée par des cellules osseuses, les ostéoblastes, et est présente en grande concentration dans la matrice extracellulaire de l'os.

Cette protéine contient trois résidus d'acide γ -carboxyglutamique en position 17, 21 et 24 et agit comme une hormone afin d'augmenter la sécrétion d'insuline par le pancréas ainsi que la sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques [113, 114]. Cette activité est dépendante de la VK, puisque lorsque le gène *Ggcx* est inactivé spécifiquement dans les ostéoblastes, il y a une diminution de la γ -carboxylation, ce qui augmente la présence de forme décarboxylée d'OCN dans le sang, la forme active d'OCN. C'est cette forme active qui permet d'avoir un meilleur taux de glucose et une meilleure sensibilité à l'insuline, protégeant ainsi contre l'obésité et le DT2 [76]. De plus, plusieurs études chez l'humain ont montré une corrélation négative entre les niveaux totaux d'OCN dans le sérum avec la résistance à l'insuline, l'obésité et le diabète [115-119]. Ces découvertes concernant le rôle de la VK et d'une protéine Gla dans le métabolisme énergétique permettent de penser que d'autres protéines Gla pourraient être impliquées dans la régulation du glucose.

Les études sur l'ostéocalcine sont les premières à démontrer l'implication d'une protéine γ -carboxylée dans le contrôle du métabolisme du glucose. Notre laboratoire travaille donc à découvrir des protéines Gla additionnelles qui pourraient être impliquées dans le métabolisme énergétique. Après avoir analysé le profil d'expression de tous les gènes connus comme codant pour des protéines Gla, il a été observé que *Gas6* est fortement exprimée dans les ostéoblastes. Puisqu'OCN est une protéine produite par les cellules osseuses et joue un rôle au niveau du métabolisme énergétique, nous avons émis l'hypothèse que Gas6, une protéine Gla aussi exprimée dans les ostéoblastes, pourrait jouer un rôle au niveau de la régulation du métabolisme énergétique. Le but de ce projet est donc d'étudier le rôle de la protéine dépendante de la vitamine K GAS6 dans le métabolisme glucose et la sensibilité à l'insuline.

2.2 Le rôle potentiel de GAS6 dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète

Plusieurs études suggèrent un potentiel rôle de GAS6 dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète. Une étude chez l'humain a démontré que le niveau de GAS6 dans le sérum est plus élevé chez les adolescents obèses, et que le niveau de GAS6 circulant corrèle

avec l'inflammation et la résistance à l'insuline [77]. Une autre étude a révélé une faible concentration de GAS6 sanguin chez des patients nouvellement diagnostiqués avec le DT2 [120]. De plus, une analyse génétique chez des adolescents a montré une corrélation entre des polymorphismes présents sur les gènes GAS6 et AXL et l'augmentation de l'IMC, l'inflammation et la résistance à l'insuline [121]. Il a été démontré que la quantité de protéine du récepteur AXL est élevée dans les tissus adipeux sous-cutanés chez les sujets obèses [122]. Chez la souris, la surexpression transgénique d'*Axl* provoque une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une résistance à l'insuline et à la progression de l'obésité, un phénotype similaire au DT2 [123]. Il est intéressant de remarquer qu'il existe une molécule inhibitrice d'AXL, soit le R428, qui est présentement en études cliniques pour le traitement du cancer. Elle pourrait être aussi bénéfique contre l'obésité, puisque le traitement des souris sur une diète riche en gras (HFD) avec cette molécule pharmacologique prévient le gain de poids [124]. Enfin, les souris déficientes en *Gas6* accumulent moins de poids que les contrôles quand elles sont mises sur une diète riche en gras (HFD) [125]. Ces études suggèrent que cette protéine dépendante de la vitamine K pourrait avoir un rôle dans le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline, et ainsi contribuer au développement de l'obésité et du DT2. Cependant, les mécanismes et les cellules cibles impliqués sont encore inconnus.

2.3 Hypothèse et objectifs

Puisque des études suggèrent un rôle potentiel de la protéine GAS6 dans la régulation du métabolisme énergétique, nous avons émis l'hypothèse que GAS6 influence le métabolisme du glucose via l'activation d'au moins un de ses récepteurs sur la surface de cellules sensibles à l'insuline. Les objectifs du projet sont les suivants :

- 1) Déterminer les conséquences d'une perte de fonction de GAS6 sur le métabolisme du glucose *in vivo*
- 2) Déterminer les conséquences d'un gain de fonction de GAS6 sur le métabolisme du glucose *in vivo*
- 3) Déterminer les conséquences d'une perte de fonction de GAS6 dans un modèle de résistance à l'insuline (HFD) *in vivo*
- 4) Définir le profil d'expression du gène *Gas6* et de ses récepteurs dans les différents tissus impliqués dans le métabolisme énergétique
- 5) Déterminer s'il y a une signalisation dépendante de GAS6 dans les cellules sensibles à l'insuline
- 6) Définir la signalisation induite par GAS6 dans les cellules sensibles à l'insuline afin de comprendre comment GAS6 influence la sensibilité à l'insuline et le métabolisme énergétique

Chapitre 3. Méthodologie

3.1 Souris

3.1.1 Souris *Gas6*^{-/-}

Les souris déficientes en GAS6 (*Gas6*^{-/-}) de fond génétique C57B/6J ont été obtenues du Dr. Peter Carmeliet (The Center for Transgene Technology and Gene Therapy, Flanders Interuniversity Institute of biotechnology, Leuven, Belgium) [126]. La mutation a ensuite été transférée dans le fond génétique FVB par rétrocroisement par le Dr. Jean-François Côté (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Canada). Les souris ont été génotypées au sevrage par PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques (Oligos #51-52-53, Tableau IV).

3.1.2 Génération de la transgénique pLiv.7-ApoE-GAS6

La souris transgénique générée dans le laboratoire est une souris surexprimant les niveaux de GAS6 dans le foie, afin d'augmenter les niveaux circulant de GAS6. L'ADNc (ADN complémentaire) murin de souris *Gas6*-Myc-His a été sous-cloné avec les enzymes de restrictions KpnI et XhoI dans le vecteur pLIV.7, qui contient les séquences régulatrices spécifiques au foie du gène humain ApoE (Figure 7) [127-129]. Ce plasmide a par la suite été testé dans des cellules hépatiques humaines, soient des HuH7, par transfection transitoire selon le protocole de la Lipofectamine 2000. Après avoir été linéarisé, le plasmide a été microinjecté dans l'ADN pronucléaire mâle dans des ovocytes fertilisés de fond génétique C57B6/J pures, via la plateforme de micro-injection de l'IRCM.

3.2 Analyses métaboliques

Les analyses métaboliques ont été effectuées sur des souris âgées de 3 mois (Tableau II). Après une mise à jeun, les souris ont été pesées et ont reçu par injection intrapéritonéale une solution de glucose ou d'insuline, dépendamment du test. Le glucose est mesuré dans le sang à l'aide du glucomètre. Pour les mesures d'insuline, le sang a été prélevé par la queue de la souris

à l'aide de capillaires traités à l'héparine, une substance anticoagulante, et le sérum a été obtenu par centrifugation à 13 000 rpm (révolution par minute) pendant 5 minutes. L'insuline a été mesurée à l'aide d'un essai ELISA commercial (*enzyme-linked immunosorbent assay*; Merckodia). Les solutions qui ont servi aux tests de tolérance ont été préparées dans du PBS (*Phosphate Buffered Saline*) commercial.

pLiv7-Gas6

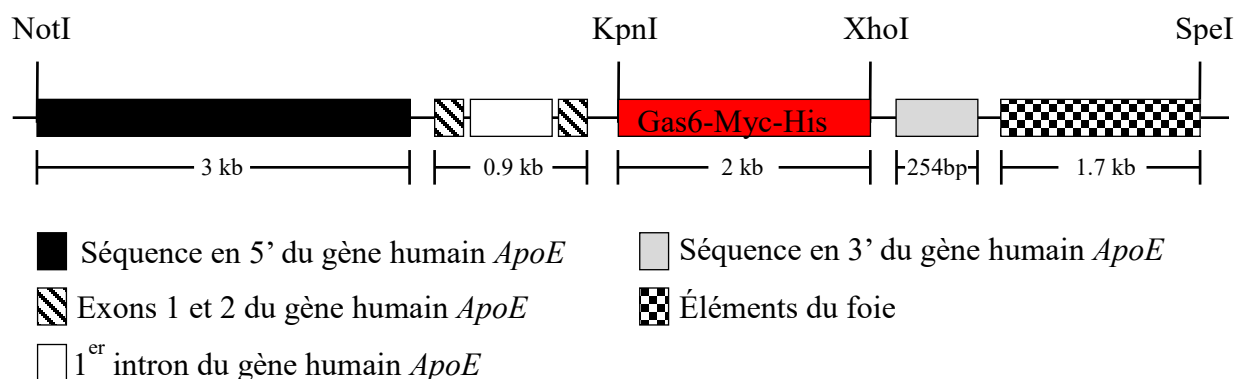


Figure 7. Représentation schématique du vecteur pLiv7 contenant l'ADNc Gas6-Myc-His utilisé pour générer la souris transgénique surexprimant Gas6 dans le foie.

3.2.1 Analyses métaboliques sur diète riche en gras

Les analyses phénotypiques des souris déficientes en *Gas6* ont été effectuées lorsque les souris sont nourries avec une diète normale ou riche en gras (45% FVB; 60% C57B6/J) ou « *high-fat diet* » (HFD). La diète normale est la diète utilisée dès la naissance de l'animal. Pour l'expérience avec les souris déficientes en *Gas6* sur fond FVB, les souris ont été mises sur la HFD à l'âge de 10 semaines, et le GTT a été effectué après 6 semaines de diètes.

Dans l'expérience effectuée avec les souris *Gas6*^{-/-} sur fond C57B6/J, les souris ont été mises sur la HFD à l'âge de 5 semaines, et les analyses métaboliques ont été effectuées après 7 semaines sur la HFD (GTT à 7 semaines; ITT à 8 semaines; GSIS à 10 semaines; imagerie à résonance magnétique (IRM) à 12 semaines; dissection à 15 semaines).

Tableau II. Tests métaboliques *in vivo*

Tests	Mise à jeun	Injection		-Temps de prélèvement (min) (Paramètre mesuré)
		Substance	Concentration	
Test de tolérance au glucose (GTT)	15 hrs (ND) 6 hrs (HFD)	Glucose	2 g/kg (ND) 1 g/kg (HFD)	-0, 15, 30, 60, 120 (Glucose sanguin)
Test de tolérance à l'insuline (ITT)	5 hrs	Insuline	0,6 U/kg (KO) 0,75 U/kg (TG)	-0, 30, 60, 90, 120 (Glucose sanguin)
Test de tolérance au pyruvate (PTT)	18 hrs	Sodium de pyruvate	2 g/kg	-0, 15, 30, 60, 120 (Glucose sanguin)
Test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose (GSIS)	15 hrs	Glucose	3 g/kg	-0, 2, 5, 15, 30 (Insuline sanguine)

3.3 Cages métaboliques

La dépense énergétique des souris a été mesurée à l'aide du système de cage métabolique Promethion (Sable System International). Ce système comprend 8 cages individuelles et permet d'obtenir des mesures au niveau de la consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone, la consommation de nourriture et d'eau, le poids des souris via une pesée, ainsi que l'activité physique, via des mesures quantitatives du mouvement horizontal et vertical, chaque seconde. Les souris ont été mises dans ces cages pour 6 jours; les premières 48 heures permettent l'acclimatation de l'animal, alors que les résultats sont calculés à partir des 4 derniers jours complets. Par la suite, les données brutes sont analysées à l'aide du logiciel ExpeData. La consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone sont mesurées en calculant la différence entre le débit entrant et sortant. La dépense énergétique est obtenue par mesure indirecte, basée sur la quantité d'oxygène consommé et le dioxyde de carbone produit.

3.4 Culture cellulaire

Les cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) ont été cultivées dans du EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) dans lequel on ajoute 10% sérum de bovin fœtal (FBS) et 1% pénicilline/streptomycine (solution P/S préparée avec 30 mM pénicilline et 10 mM streptomycine). Les cellules C2C12 (lignée de myoblastes de souris) ont été cultivées en myoblastes (forme non-différenciée) dans du DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) 20% FBS et 1% P/S. Pour induire la différenciation des myoblastes en myotubes, les cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM contenant 2% de sérum de cheval et 1% P/S, pendant environ 5 à 7 jours (Figure 8). Les cellules ont été incubées à 37°C, avec 5% de CO₂.

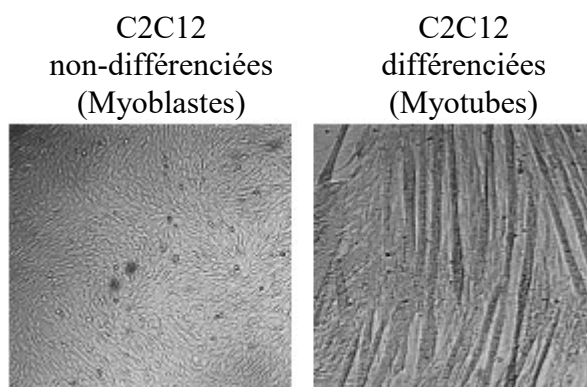


Figure 8. Différenciation des C2C12

Les myoblastes sont différenciés en myotubes par le sérum de cheval. Microscopie à contraste de phase. (Résultats du Dre Julie Lacombe)

3.4.1 Production du GAS6 recombinant

Le surnageant contenant le GAS6 recombinant ainsi que le surnageant contrôle utilisés dans les expériences *in vitro* a été produit par les HEK293, soit par transfection transitoire (par Lipofectamine 2000 selon les recommandations) ou stable du plasmide contenant l'ADNc Gas6-Myc-His ou le plasmide vide. Lorsque les cellules étaient confluentes, elles ont été lavées 2 fois avec du PBS stérile et le milieu de culture a été remplacé par du EMEM sans sérum avec 1%

P/S, dans lequel a été ajouté 22 μ M de vitamine K, pour s'assurer de la γ -carboxylation complète de GAS6. Après 2 jours, le surnageant des cellules a été récolté, puisque GAS6 est une protéine sécrétée, et centrifugé afin de se débarrasser des débris cellulaires qu'il pourrait y avoir dans le surnageant.

3.4.2 Quantification de la protéine GAS6

La concentration de GAS6 a été mesurée avec la technique immuno-enzymatique ELISA (Mouse Gas6 DuoSet ELISA, R&D Systems). D'abord, 100 μ L d'anticorps de capture (Goat Anti-Mouse GAS6) est appliqué dans les puits d'une plaque ELISA de 96-puits à une concentration de 0,4 μ g/mL, dilué dans du PBS. Après une incubation d'une nuit à température pièce, la plaque est lavée 3 fois avec 400 μ L de tampon de lavage (PBS dans lequel on ajoute du Tween20 à 0,05% final). On dépose 300 μ L de diluant de réaction (PBS dans lequel on ajoute 1% de BSA) dans les puits et on laisse incuber pendant au moins une heure, afin de bloquer les puits la liaison non spécifique au plastique. À partir de cette étape, toutes les dilutions d'échantillons, de standards et d'anticorps sont faites dans cette solution de dilution. Pendant l'incubation, les échantillons et les standards sont préparés à la dilution voulue. Les concentrations des standards utilisées sont les suivantes : 90 ng/mL (concentration stock), 45 ng/mL, 22,5 ng/mL, 11,25 ng/mL, 5,625 ng/mL, 2,8125 ng/mL, 1,40625 ng/mL et 0 ng/mL. Après avoir lavé la plaque 3 fois avec le tampon de lavage, on ajoute 98 μ L du diluant de réaction dans les puits et 2 μ L des échantillons ou des standards et laisse incuber pendant 2 heures à température pièce et à 600 rpm. Suite aux 3 lavages, 100 μ L d'anticorps de détection à une concentration de 200 ng/mL est ajouté aux puits, et incubé pendant 2 heures à 600 rpm à température pièce. La plaque est de nouveau lavée 3 fois, 100 μ L de streptavidine-HRP dilué 1:200 est ajouté et la plaque est incubée pendant 20 minutes dans le noir à température pièce. Après 3 lavages, on ajoute 100 μ L de substrat TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) aux puits et on laisse incuber dans le noir jusqu'à un maximum de 30 minutes. Pour arrêter la réaction, on ajoute 100 μ L de HCl 2N. La densité optique est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque, à une longueur d'onde de 450 nm corrigée à 650 nm. Les résultats sont ensuite calculés à l'aide de la courbe standard.

3.4.3 Expériences de signalisation *in vitro*

Afin d'étudier la signalisation de GAS6 dans les cellules musculaires, le surnageant contenant le GAS6 recombinant a été utilisé pour traiter les C2C12 différenciées en myotubes. Avant le traitement, le milieu de culture a été changé afin de diminuer la concentration de sérum, soit du DMEM avec 0,5% de HS et 1% P/S, pour 15 heures. Par la suite, les cellules ont été mises pendant 90 minutes dans un milieu DMEM sans sérum, contenant 10 mM d'HEPES pH 4; 0,5% de BSA et 1% de P/S. Pour le traitement des cellules avec le GAS6 recombinant, une quantité 1 : 1 de surnageant a été mis, par rapport au milieu de culture, pour une concentration finale de 300 ng/mL. Puisque le GAS6 recombinant utilisé est un surnageant de cellules HEK293, il est important d'avoir un contrôle, soit le surnageant provenant de cellules transfectées avec le vecteur vide, afin d'assurer que le résultat du traitement est dû uniquement à la protéine GAS6.

Pour les expériences avec les inhibiteurs pharmacologiques R428 et LDC1267, le milieu de culture des myotubes a été changé pour 15 heures avec du DMEM contenant 0,5% de HS et 1% P/S. Par la suite, lorsque les cellules ont été mises dans un milieu sans sérum, les inhibiteurs ont été ajoutés afin de prétraiter les cellules et d'inhiber la signalisation basale. Ensuite, lorsque le surnageant contenant le GAS6 recombinant ou le surnageant contrôle a été ajouté, l'inhibiteur est encore ajouté, afin de s'assurer d'avoir la bonne concentration finale. Puisque les inhibiteurs sont dilués directement dans du DMSO (diméthylsulfoxyde), une condition contenant seulement le DMSO a été ajoutée : le DMSO a été mis au prétraitement et lors du traitement, comme les inhibiteurs.

3.5 Immunobuvardage de style Western et immunoprécipitation

3.5.1 Préparation des échantillons

Les cellules ont été lysées pendant 10 minutes dans une solution contenant 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM EGTA, 2,5 mM NaPyrophosphate, 1 mM β -glycérophosphate, 10 mM NaF, 1% Triton, 1X d'inhibiteur de protéase (Roche), 1 mM Fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), 1 mM Vanadate. Les extraits de tissus ont été

préparés par homogénéisation dans la solution de lyse précédemment décrite. Les extraits ont ensuite été centrifugés et le surnageant utilisé pour les expériences. Ensuite, les protéines ont été quantifiées en utilisant la méthode de Bradford.

Les protéines ont été immunoprécipitées en utilisant des anticorps qui seront récupérés par des billes d'agarose couplées à des protéines G. D'abord, 1 mg d'extraits protéiques a été incubé une nuit en présence de 20 μ L d'anticorps (Santa Cruz, C-20), à 4°C et par inversion. Cela permet l'attachement de l'anticorps à la protéine spécifique. Le lendemain, les billes couplées aux protéines G ont été préalablement lavées 4 fois avec du tampon de lyse, pour être ensuite ajoutées dans la solution de protéines et d'anticorps, pendant 2h à 4°C sous agitation. Les anticorps liés aux protéines G sur les billes d'agarose vont s'agglutiner. Par la suite, les billes sont lavées 4 fois avec du tampon de lyse. Les échantillons sont ensuite dénaturés pendant 10 minutes à 80°C dans le tampon de Laemmli. Pour ce qui est de l'immunobuvardage des extraits totaux, les échantillons sont quantifiés et directement dénaturés, sans passer par l'étape des billes d'agarose.

3.5.2 Électrophorèse SDS-PAGE et transfert sur membrane

La technique d'électrophorèse SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) à migrer des protéines dénaturées dû à l'ajout de SDS (dodécylsulfate de sodium) dans un gel sous l'influence d'un champ électrique et permet la séparation de moléculaire en fonction de leur taille, le SDS conférant une charge négative aux protéines. Les protéines sont d'abord condensées dans un gel de concentration de 4% et pH 6,8. Les protéines migrent ensuite dans un gel de résolution, qui est un gel de polyacrylamide constitué par la polymérisation d'acrylamide et de bisacrylamide et de pH 8,8. La concentration en acrylamide varie donc en fonction de la taille des protéines étudiées : dans le cas présent, des gels de 6,5% et 7,5% ont été utilisés. Les gels SDS-PAGE sont mis dans un tampon de migration contenant Tris/HCl 20 mM, Glycine 190 mM et 0,1% de SDS; la migration est faite à 120 V (Volt constant) pendant environ 2 heures. Par la suite, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose à 300 mA (Ampères constants) pendant 1 heure, dans un tampon de transfert contenant du Tris/HCl 20 mM, Glycine 190 mM et 20% de méthanol.

3.5.3 Détection des protéines

La membrane est ensuite incubée 1 heure à température pièce dans une solution dite de « blocage », afin de bloquer les sites de liaison non spécifique (liaison entre anticorps et membrane). Cette solution contient du TBS-T (Tris/HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, et ajustement avec du HCl au pH 7,5 avec 0,1% de Tween20) ainsi que du lait en poudre sans matières grasses, de l'albumine de sérum bovin (BSA) ou du sérum de cheval (HS) à 5%. Après 3 lavages au TBS-T, la membrane est incubée toute la nuit à 4°C avec agitation, avec l'anticorps primaire adéquat dilué dans du TBS-T/5% lait ou BSA ou HS, selon l'anticorps. Le jour suivant, la membrane est lavée 3 fois 10 minutes avec agitation dans du TBS-T, pour être par la suite incubée 1 heure à température pièce dans une solution contenant l'anticorps secondaire dilué dans du TBS-T/5% lait ou HS. Après 3 lavages au TBS-T et un lavage au TBS, la détection est effectuée par chimiluminescence (Clarity, Bio-Rad) en utilisant l'exposition sur des films photographiques. La quantification relative se fait par densitométrie à l'aide du logiciel « Image J ».

3.6 Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR quantitative

Toutes les solutions pour l'extraction d'ARN sont préparées à partir d'eau DEPC autoclavée (0,1% DEPC dans de l'eau double distillée ou ddH₂O). Lorsque l'extraction d'ARN est faite à partir de cellules, 500 µL de solution de lyse (Guanidium Thiocyanate 4 M; Sodium citrate 25mM, pH 7; EDTA 1 mM, pH8; Lauryl-sarcosine 0,5%; β-mercaptoethanol 0,1 M) est ajouté directement sur les cellules. Le lysat est ensuite mis dans des tubes et conservé à -80°C jusqu'à l'extraction. En ce qui concerne les tissus, ils sont mis congelés dans le tampon de lyse et homogénéisés. L'homogénat obtenu est centrifugé et c'est le surnageant qui est utilisé pour l'extraction d'ARN. Par la suite, le protocole est le même pour les cellules et les tissus. L'extraction est faite en ajoutant séquentiellement 50 µL d'acétate de sodium 2M pH4, 500 µL de phénol saturé pH 4,5 et 200 µL d'un mélange 40 : 9 de chloroforme:alcool isoamyl. Ce mélange est incubé 15 minutes sur glace et ensuite centrifugé pour 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C. La phase aqueuse est alors transférée dans un nouveau tube, dans lequel on ajoute une part

égale d'isopropanol; on laisse l'ARN précipiter au moins 1 heure à -20°C. Après une centrifugation de 20 minutes, on lave le culot avec 70% d'éthanol, et l'ARN ainsi obtenu est resuspendu dans de l'eau DEPC. La qualité des ARN est ensuite vérifiée en mesurant la densité optique (DO) au Nanodrop et en vérifiant la qualité des ARN ribosomaux sur gel d'agarose 1,2%. Par la suite, 1 µg d'ARN est utilisé pour produire l'ADNc. L'ARN est préalablement traité avec à la déoxyribonucléase (DNase I, Invitrogen), afin d'éliminer toute trace résiduelle d'ADN. On procède par la suite à la synthèse de l'ADNc par transcription inverse en utilisant l'enzyme M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*, Invitrogen), selon le protocole recommandé. Lorsque la réaction est complétée, l'ADNc est dilué 3 fois (1/3) et conservé à -20°C.

Les réactions de PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative (qPCR) ont été faites avec l'agent fluorescent SYBR Green, avec 2 µL d'ADNc et les amorces à 10 mM (sens et antisens). Les conditions du programme d'amplification du qPCR sont décrites dans le tableau suivant (Tableau III), et les données ont été enregistrées avec le système Viia7 de Lifetechnologies.

Tableau III. Conditions du programme d'amplification de qPCR

Température	Temps	Cycles	
95°C	15 min	1	
95°C	10 sec	40	
60°C	30 sec		
95°C	1 min	1	Courbe de dissociation
55°C	30 sec	1	
95°C	30 sec	1	

3.7 Séquençage d'ARN

Trois conditions ont été analysées lors de l'expérience : C2C12 traitées avec le surnageant contrôle et du DMSO (contrôle négatif), C2C12 traitées avec GAS6 et DMSO, C2C12 traitées avec GAS6 et le LDC1267. Les myotubes sont incubés dans un milieu de culture avec une faible concentration de sérum pour 15 heures (DMEM contenant 0,5% de HS et 1% P/S). Par la suite, les cellules sont incubées dans un milieu sans sérum en présence soit de

l'inhibiteur ou du DMSO pour 1 heure 30 minutes, afin d'inhiber la signalisation basale. Par la suite, le surnageant contenant le GAS6 recombinant ou le milieu contrôle est ajouté, l'inhibiteur est encore ajouté, afin de s'assurer d'avoir la bonne concentration finale. Le traitement se fait pendant 4 heures, et les cellules sont ensuite lysées.

L'extraction d'ARN à partir des cellules a été faite en utilisant les colonnes RNeasy (*RNeasy mini kit*, Qiagen) selon le protocole recommandé. Le séquençage d'ARN a été effectué au plateau technologique de biologie moléculaire et génomique fonctionnelle de l'IRCM, avec le système de séquençage Haut Débit sur l'instrument HiSeq 2000 d'Illumina. Les librairies sont préparées à partir de l'ARN total, en utilisant un enrichissement poly(A).

3.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism. Les analyses statistiques suivantes ont été utilisées : Analyse de la variance à un facteur de variance (One-way ANOVA) et à deux facteurs de variance (Two-way ANOVA), et le test T de Student. Une valeur $P < 0,05$ est considérée comme significative.

3.9 Listes des anticorps et oligonucléotides

Tableau IV. Liste des oligonucléotides utilisés dans ce projet, avec les séquences et l'utilisation de ceux-ci

#*	Gène	Amorces	Séquence 5'→3'	Utilisation
39	<i>Actb</i>	Sens	GACCTCTATGCCAACACAGT	qPCR
40	<i>Actb</i>	Antisens	AGTACTTGCGCTCAGGAGGA	qPCR
70	<i>Axl</i>	Sens	CCAGTCACAGGACACAGCTC	qPCR
71	<i>Axl</i>	Antisens	ATACCCACCCCATCGTCTGA	qPCR
393	<i>Eif4ebp1</i>	Sens	GTGTGCGAACTCACCTGTGG	qPCR
394	<i>Eif4ebp1</i>	Antisens	ATCATTGCGTCCTACGGCTG	qPCR
368	<i>Gapdh</i>	Sens	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	qPCR
369	<i>Gapdh</i>	Antisens	TAGGGCCTCTCTTGCTCAGT	qPCR
51	<i>Gas6</i>	Sens	GAGTGCCGTGATTCTGGTC	Génotypage
52	<i>Gas6</i>	Antisens	CCACTAAGGAAACAATAACTG	Génotypage
53	<i>Gas6</i>	Sens	ATCTCTCGTGGGATCATT	Génotypage
43	<i>Gas6</i>	Sens	ATGAAGATCGCGGTAGCTGG	qPCR et génotypage TG
44	<i>Gas6</i>	Antisens	CCAACTCCTCATGCACCCAT	qPCR et génotypage TG
89	<i>Gas6</i>	Sens	AATTGAATTCGCCACCATGCCGC CACCGCCCGGG	qPCR (EcoRI)
90	<i>Gas6</i>	Antisens	TTAATCTAGAGGGGTGGCATGCT CCACAGG	qPCR (XbaI)
240	<i>Gas6</i>	Sens	ATTACGGTACC GCCACC ATGCCGCCACCG	Clonage pLIV.7 (KpnI)
241	<i>Gas6</i>	Antisens	GTAAT CTCGAG TCA ATGGTGATGGTGATGATGAC	Clonage dans pLIV.7 (XhoI)
242	<i>Gas6</i>	Sens	GAAC TTGCCAGGCTCCTACTC	Séquençage clone (655 pb)
243	<i>Gas6</i>	Antisens	AGCGATCCTGCTGCTGGCAC	Séquençage clone (710 pb)
244	<i>Gas6</i>	Sens	GAGACAGTCAAGGCAAACACAA	Séquençage clone (1400 pb)
245	<i>Gas6</i>	Sens	CACAAAGGGCCAGAGTGAAG	Séquençage clone (2025 pb)
35	<i>Hprt</i>	Sens	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	qPCR
36	<i>Hprt</i>	Antisens	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG	qPCR
355	<i>Insig1</i>	Sens	AGATCCAGCGGAATGTCACG	qPCR
356	<i>Insig1</i>	Antisens	GTGGTTCTCCCAGGTGACTG	qPCR
359	<i>Irs2</i>	Sens	CACAATTCCAAGCGCCACAA	qPCR
360	<i>Irs2</i>	Antisens	CATCACCTCCTCCCAGGGTA	qPCR
73	<i>Mertk</i>	Sens	GGTTCTGGCCCCACTGCTAC	qPCR
74	<i>Mertk</i>	Antisens	CAGAGAATGGCCTGTGGTTGA	qPCR
75	<i>Tyro3</i>	Sens	ACGATCTCCAGCTACAACGC	qPCR
76	<i>Tyro3</i>	Antisens	TTGTCTGAAAGGGCACCAG	qPCR

*Le numéro des amorces indiqué dans ce tableau est celui utilisé dans le laboratoire.

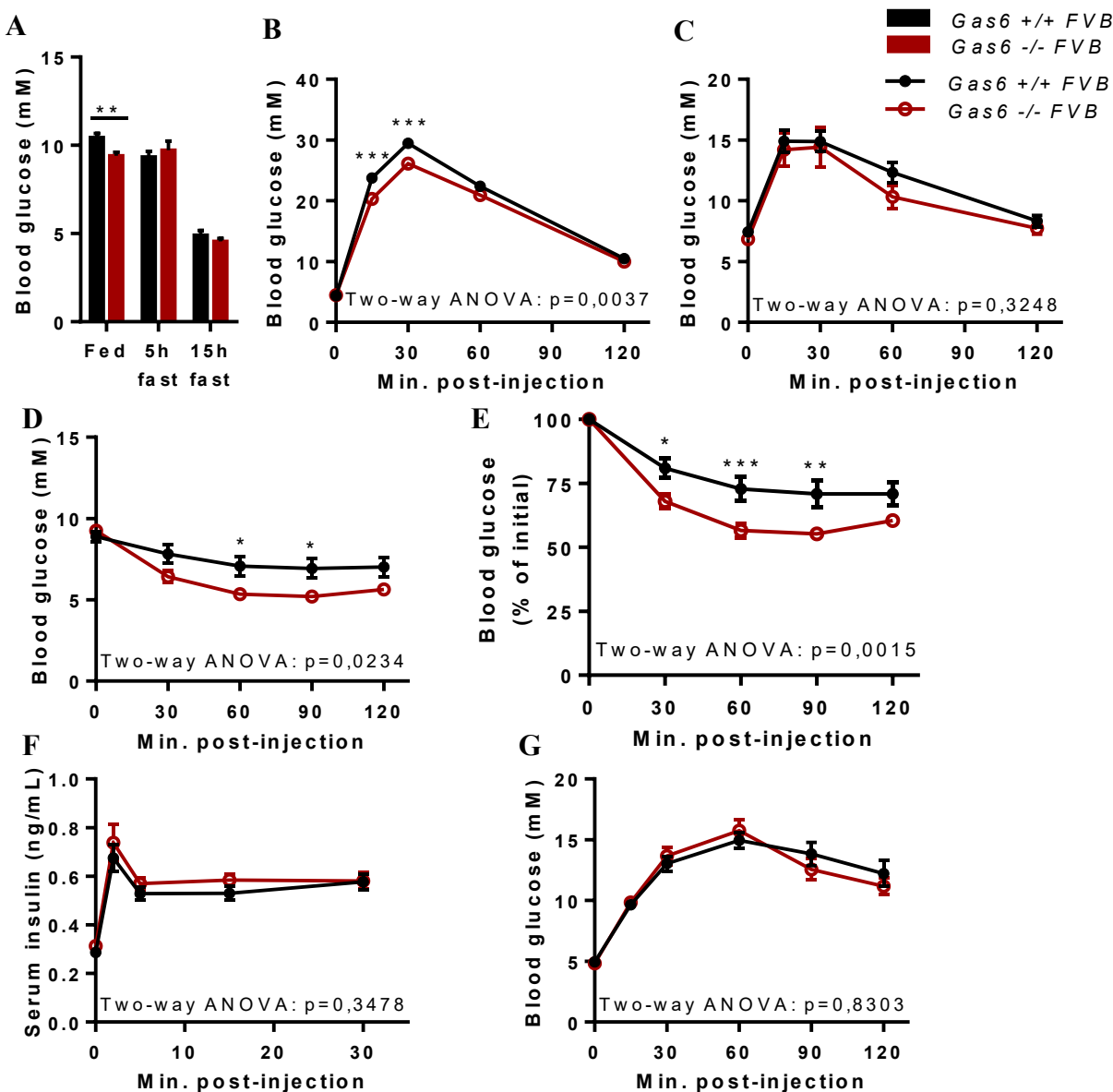
Tableau V. Liste des anticorps utilisés et les conditions de dilution

Anticorps	Dilution	Espèce	Numéro	Compagnie
P-Axl (Y709)	1:1000 dans lait 5%	Lapin	5724S	Cell Signaling
AXL	1:1000 dans HS 5%	Chèvre	C-20	Santa Cruz
P-GSK3 α / β (S21/9)	1:3000 dans BSA 5%	Lapin	8566S	Cell Signaling
GSK3 α / β	1:3000 dans BSA 5%	Lapin	5676P	Cell Signaling
P-IGF-IR- β (Y1135/1136)	1:1000 dans BSA 5%	Lapin	3024S	Cell Signaling
InsR- β	1:1000 dans lait 5%	Souris	3020S	Cell Signaling
P-AKT (T308)	1:2000 dans BSA 5%	Lapin	13038D	Cell Signaling
P-AKT (S473)	1:2000 dans BSA 5%	Lapin		Cell Signaling
AKT (pan)	1:2000 dans BSA 5%	Lapin	4691P	Cell Signaling
Myc	1:1000 dans BSA 5%	Souris	2276S	Cell Signaling
Anti-chèvre-HRP	1:2000 dans lait 5%		172-1034	Bio-Rad
Anti-chèvre-HRP	1:5000 dans HS 5%			Jackson immuno.
Anti-souris-HRP	1:5000 dans lait 5%	Chèvre	115-035-174	Jackson immuno.
Anti-lapin-HRP	1:5000 dans lait 5%	Souris	211-032-171	Jackson immuno.

Chapitre 4. Résultats

4.1 Conséquences d'une perte de fonction de Gas6 sur le métabolisme du glucose *in vivo*

Afin de déterminer les fonctions de la protéine GAS6 sur le métabolisme du glucose *in vivo*, le phénotype métabolique de souris déficientes en GAS6 (*Gas6*^{-/-}) a été analysé. Nous avons d'abord effectué ces expériences avec des souris de fond génétique FVB puisque nous avons obtenu celles-ci du Dr Jean-François Côté. (Figure 9). D'abord, il est intéressant de noter que les souris déficientes en GAS6 sur fond génétique FVB ont une glycémie postprandiale plus basse que les souris de type sauvages sur le même fond génétique (Figure 9, A). Les souris *Gas6*^{-/-} ont une meilleure tolérance au glucose lorsqu'elles reçoivent 2 g/kg de glucose avec une mise à jeun de 15h qui n'est pas visible lorsque les souris reçoivent 1 g/kg de glucose suite à une mise à jeun de 6h (Figure 9, B-C). Cette augmentation de la tolérance au glucose est en partie expliquée par l'amélioration de la sensibilité à l'insuline révélée le test de tolérance à l'insuline (ITT) (Figure 9, D-E), mais la sécrétion d'insuline ne semble pas affectée (Figure 9, F). Le test de tolérance au pyruvate (PTT) permet de déterminer s'il y a des modifications au niveau de la gluconéogenèse : le pyruvate est utilisé comme substrat au cours de cette réaction afin de former du glucose, c'est pourquoi la glycémie augmente au cours du PTT. Puisqu'il n'y a pas de différence significative du taux de glucose entre les souris *Gas6*^{+/+} et *Gas6*^{-/-}, la gluconéogenèse ne semble pas affectée par GAS6 (Figure 9, G). Nous avons tenté de poursuivre l'étude métabolique des souris *Gas6*^{-/-} à l'aide d'un modèle d'obésité, en les nourrissant avec une nourriture riche en gras ou « high-fat diet » (HFD). Nous avons cependant découvert que les souris de type sauvage ne prenaient pas autant de poids en comparaison avec d'autres études, dû au fait que les souris FVB sont résistantes à l'induction d'une obésité induite par une HFD (voir section 4.3, Figure 17) [130]. Nous avons donc décidé de reprendre l'étude métabolique des souris *Gas6*^{-/-} sur fond génétique C57B6/J (Figure 10). Il est important de noter que les résultats obtenus sur le fond génétique FVB permettent de tirer des conclusions similaires aux résultats obtenus avec les souris sur fond génétique C57B6/J, malgré que les résultats ne sont pas identiques.



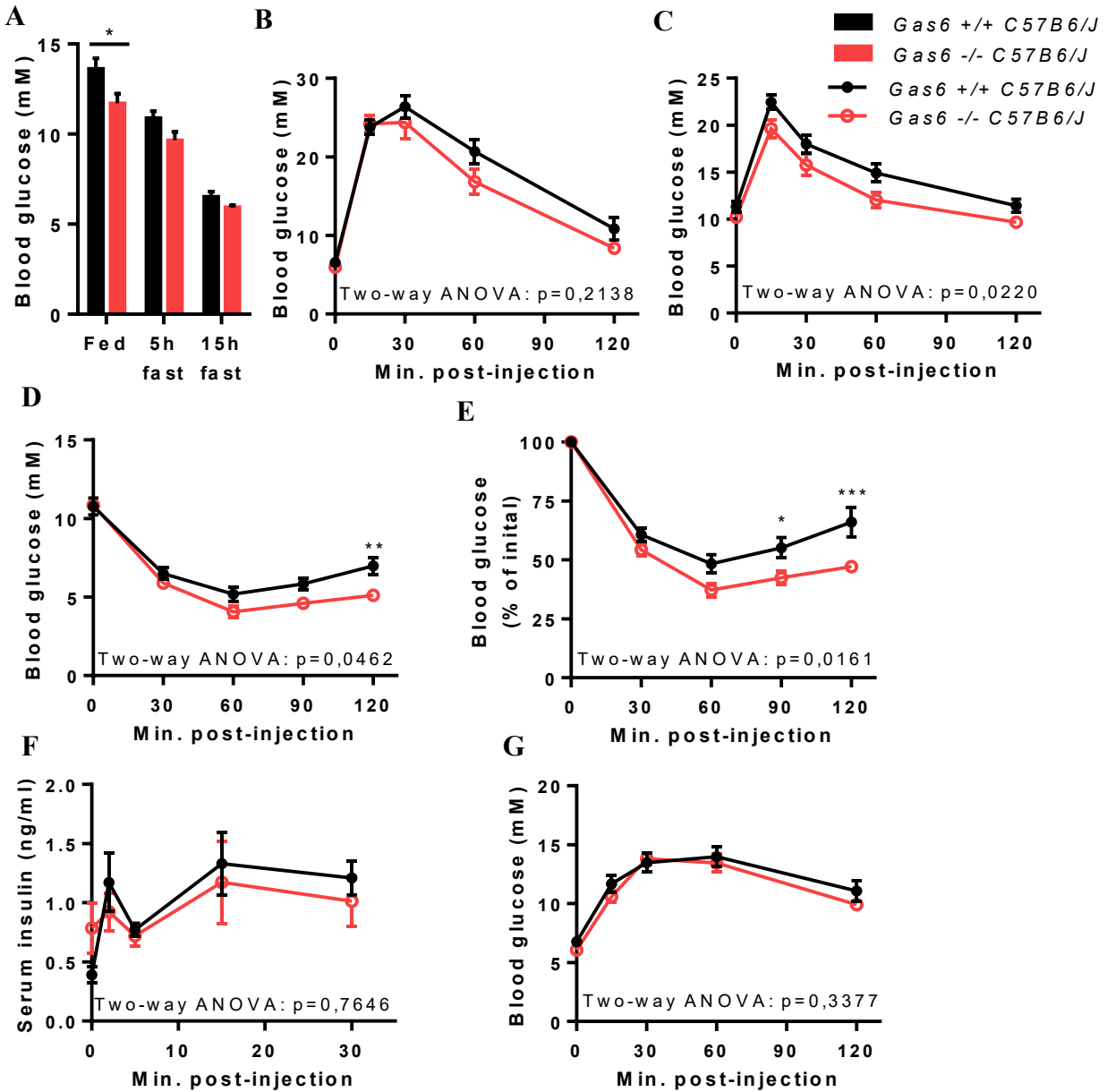


Figure 10. Phénotype métabolique des souris déficientes en GAS6 sur fond génétique C57B6/J à 3 mois.

(A) Glucose sanguin à jeun (5-15h) ou non ($n=8-10$). (B) IPGTT avec 2 g/kg de glucose, 15h de mise à jeun ($n=7-9$). (C) IPGTT avec 1 g/kg de glucose, 6h de mise à jeun ($n=11-8$). (D-E) ITT avec 0,6 U/kg d'insuline, 5h de mise à jeun ($n=9-8$). (F) GSIS avec 3 g/kg de glucose, 15h de mise à jeun ($n=8-7$). (G) PTT avec 2 g/kg de sodium de pyruvate, 18h de mise à jeun ($n=8-7$). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique « two-way ANOVA » représente la différence significative entre les génotypes. Le test post-hoc de Bonferonni représentent les comparaisons multiples entre les différents groupes aux différents temps : * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Au niveau de la tolérance au glucose, on remarque que l'amélioration est plutôt lorsque les souris sont challengées avec 1 g/kg de glucose et mise à jeun pour 6h (Figure 10, C) (l'aire sous la courbe est significativement différente, à $P < 0,05$ suite à un test de Student), ce qui diffère des souris FVB. La sensibilité à l'insuline est aussi augmentée, mais l'amélioration apparaît plus tard au cours du ITT chez les souris sur le fond C57B6/J (90 et 120 minutes post-injection) (Figure 10, D-E), comparativement aux souris sur fond FVB (30, 60 et 90 minutes post-injection). Au niveau de la sécrétion d'insuline, les niveaux d'insuline plasmatique sont légèrement plus élevés chez les souris déficientes en Gas6 lorsqu'elles sont mises à jeun pour 15h, comparativement aux souris de type sauvages (Figure 10, F). Les conclusions qui découlent des résultats obtenus sur les souris de fond génétique FVB et C57B/6J mènent à montrer une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline chez les souris déficientes en Gas6.

Par la suite, nous avons testé si les effets de GAS6 sur la sensibilité à l'insuline sont associés avec des changements au niveau de la dépense énergétique et/ou de la prise de nourriture. Les souris ont été placées dans des cages individuelles d'un système de cages métaboliques afin de prendre des mesures au niveau de la consommation d'oxygène (VO_2) et la production de dioxyde de carbone (VCO_2), la consommation de nourriture et d'eau, le poids des souris via une pesée, ainsi que l'activité physique horizontale (axes X, Y) et verticale (axe Z). Les données de dépenses énergétiques sont obtenues par mesures indirectes, à l'aide des VO_2 et VCO_2 (Figure 11 et Figure 12).

Les données obtenues montrent que GAS6 n'a pas d'effet au niveau de la dépense énergétique, autant pour les souris sur fond génétique FVB que C57B6/J. Un fait intéressant à remarquer est au niveau du cycle circadien. La souris est un animal nocturne, donc elles sont beaucoup plus actives la nuit que le jour. Les résultats obtenus concernant l'activité physique des souris sur fond FVB (Figure 11, F-H) montrent que les souris de type sauvages sont environ 20% plus actives la nuit. Cependant, pour les souris de fond génétique C57B6/J (Figure 12, F-G), l'activité des souris augmente d'environ 50% durant la nuit.

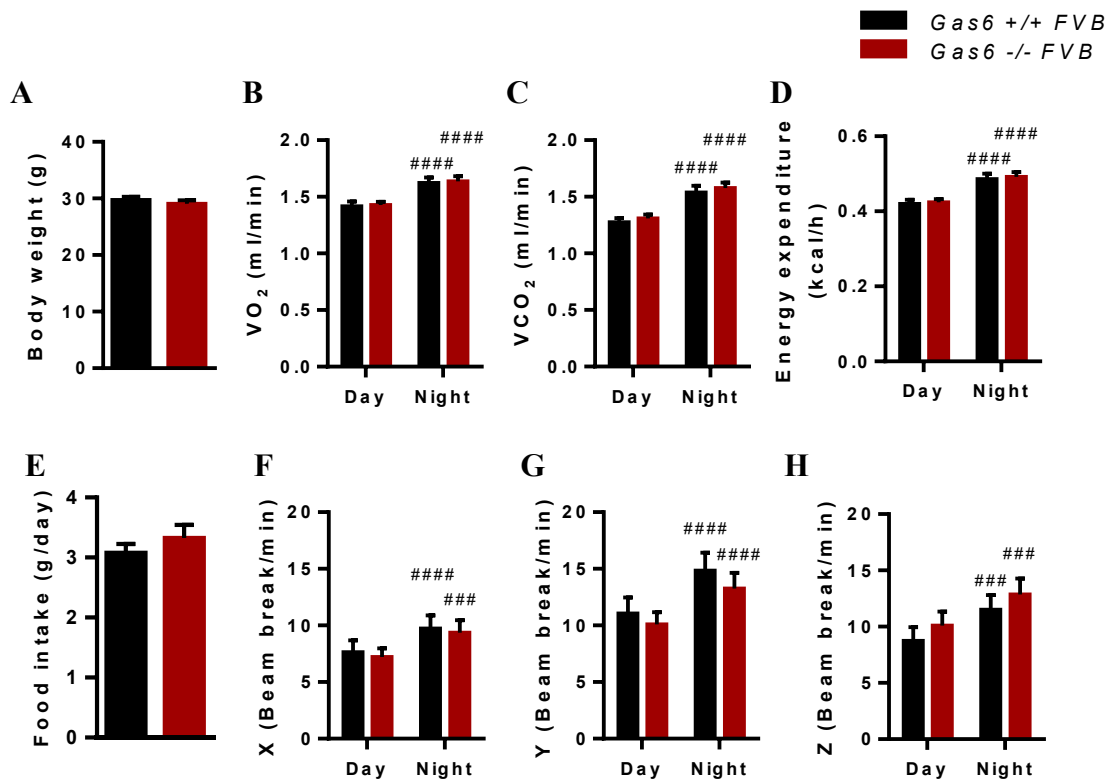


Figure 11. Phénotype énergétique des souris déficientes en GAS6 sur fond génétique FVB à 3 mois.

(A) Moyenne du poids des souris pendant l'expérience. (B) Volume d'oxygène consommé par minute. (C) Volume de dioxyde de carbone produit par minute. (D) Dépense énergétique, soit RER (*Respiratory exchange ratio*), calculée indirectement à partir des données récoltées (soit VCO_2/VO_2). (E) Consommation de nourriture par jour. (F-H) Mesures quantitatives du mouvement horizontal (axes X et Y) et vertical (axe Z). n=12 par groupe. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. Le test post-hoc de Bonferroni représentent les comparaisons multiples entre le jour et la nuit dans un même groupe : $p > 0,05$. ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$.

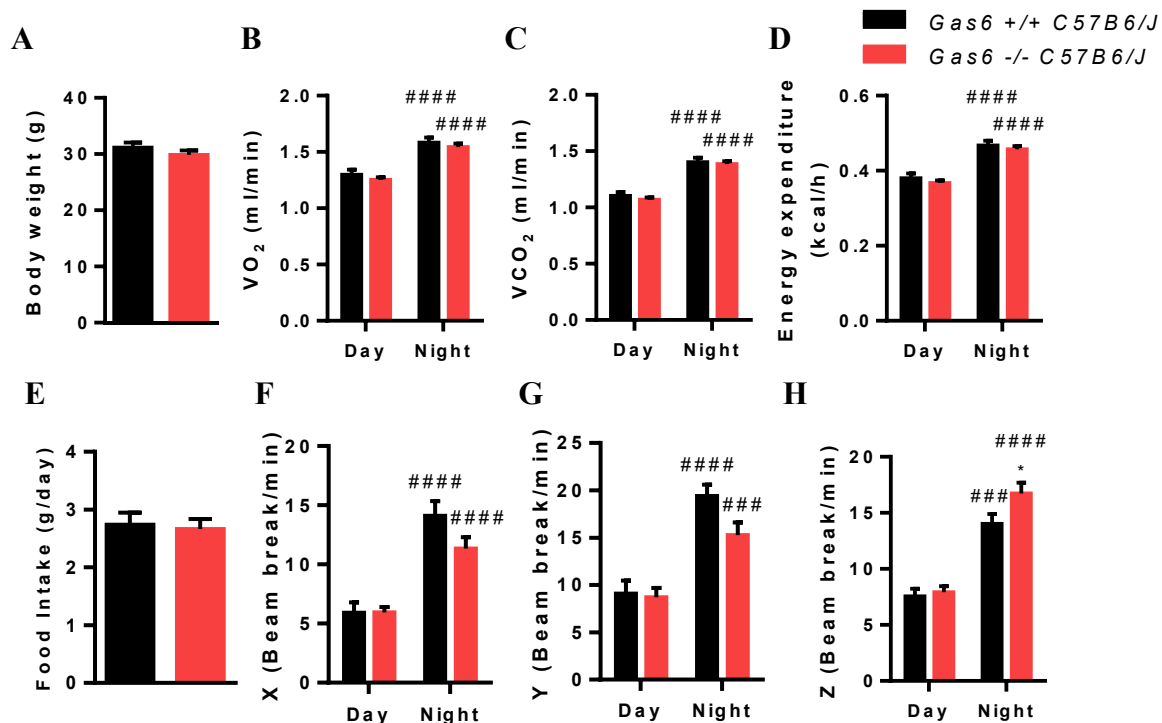


Figure 12. Phénotype énergétique des souris déficientes en GAS6 sur fond génétique C57B6/J à 3 mois.

(A) Moyenne du poids des souris pendant l'expérience. (B) Volume d'oxygène consommé par minute. (C) Volume de dioxyde de carbone produit par minute. (D) Dépense énergétique, soit RER (*Respiratory exchange ratio*), calculée indirectement à partir des données récoltées (soit VCO_2/VO_2). (E) Consommation de nourriture par jour. (F-H) Mesures quantitatives du mouvement horizontal (axes X et Y) et vertical (axe Z). n=8 par groupe. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. Le test post-hoc de Bonferroni représente les comparaisons multiples entre le jour et la nuit dans un même groupe ($p>0,05$. #### $p<0,0001$; ##### $p<0,0001$) et entre les génotypes au même temps (* $p<0,05$).

Afin de comprendre les mécanismes par lesquels l'absence de GAS6 augmente la sensibilité à l'insuline *in vivo*, nous avons analysé la voie de signalisation de l'insuline plus en détail, dans le but d'avoir un aperçu de l'endroit où GAS6 pourrait agir sur cette signalisation. Pour ce faire, la réponse à l'insuline au niveau moléculaire a été mesurée dans trois tissus, soit le muscle, le tissu adipeux et le foie, puisque ce sont ces tissus qui sont majoritairement impliqués dans le métabolisme du glucose en réponse à l'insuline. Suite à une injection d'insuline intraveineuse, nous avons mesuré les niveaux de phosphorylation de différentes kinases impliquées dans cette voie (récepteur de l'insuline, AKT, Gsk3 α/β). Chez les souris de type sauvages, une injection d'insuline induit la phosphorylation du récepteur de l'insuline (aux résidus Y1150/Y1151) et d'AKT (aux résidus S473 et T308). Cette phosphorylation est présente aussi au niveau de Gsk3 α/β (aux résidus Ser21/9), mais de façon moins marquée. Chez les souris déficientes en GAS6, la phosphorylation du récepteur de l'insuline et d'AKT est beaucoup moins marquée. En effet, les niveaux de phosphorylation de ces deux protéines sont significativement plus bas chez les souris *Gas6*^{-/-} comparativement aux souris de type sauvages, suite à une injection d'insuline (Figure 13). Ce résultat suggère que la déficience en GAS6 augmente la sensibilité à l'insuline *in vivo*, mais sans augmenter l'activation du récepteur à l'insuline, AKT et GSK3 α/β dans le muscle et le tissu adipeux. C'est un résultat en apparence paradoxal, mais qui suggère que GAS6 agirait en aval de ces kinases pour augmenter la sensibilité à l'insuline.

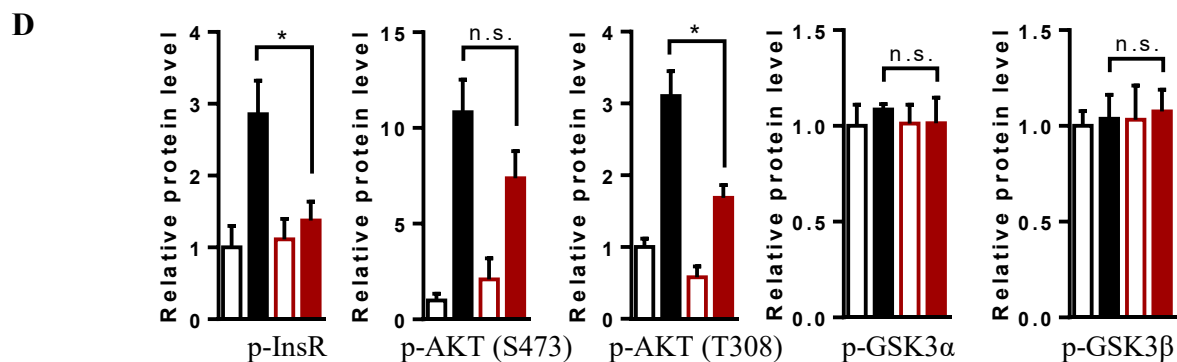
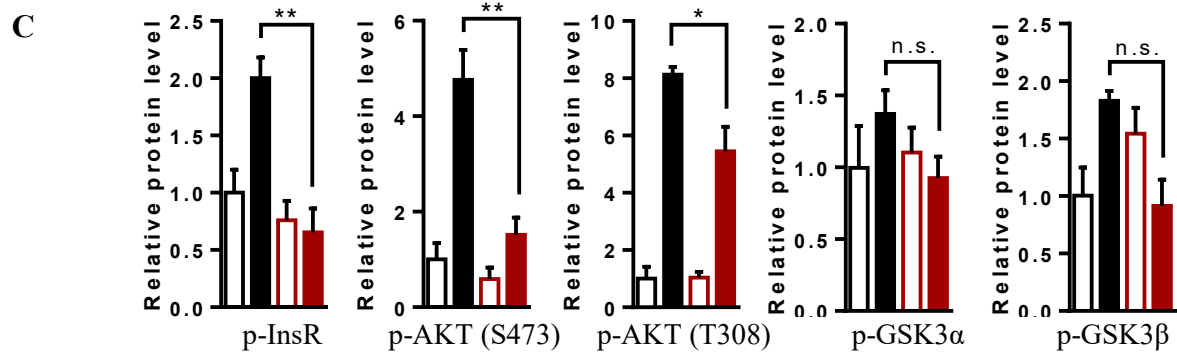
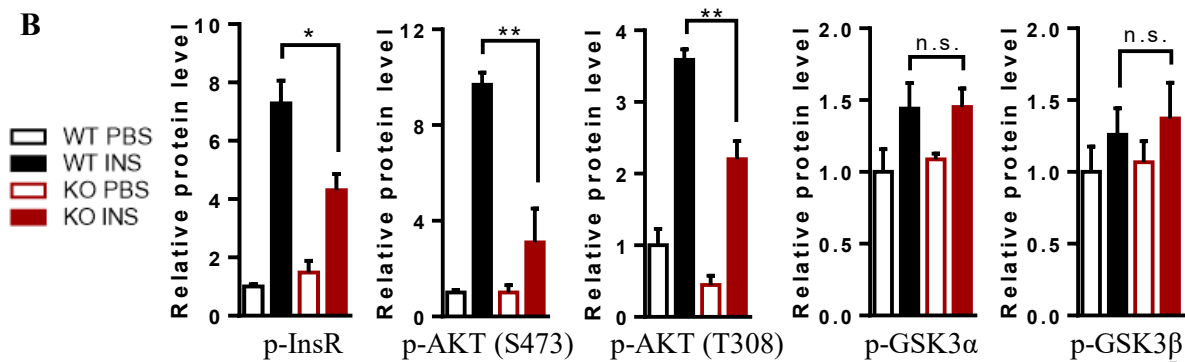
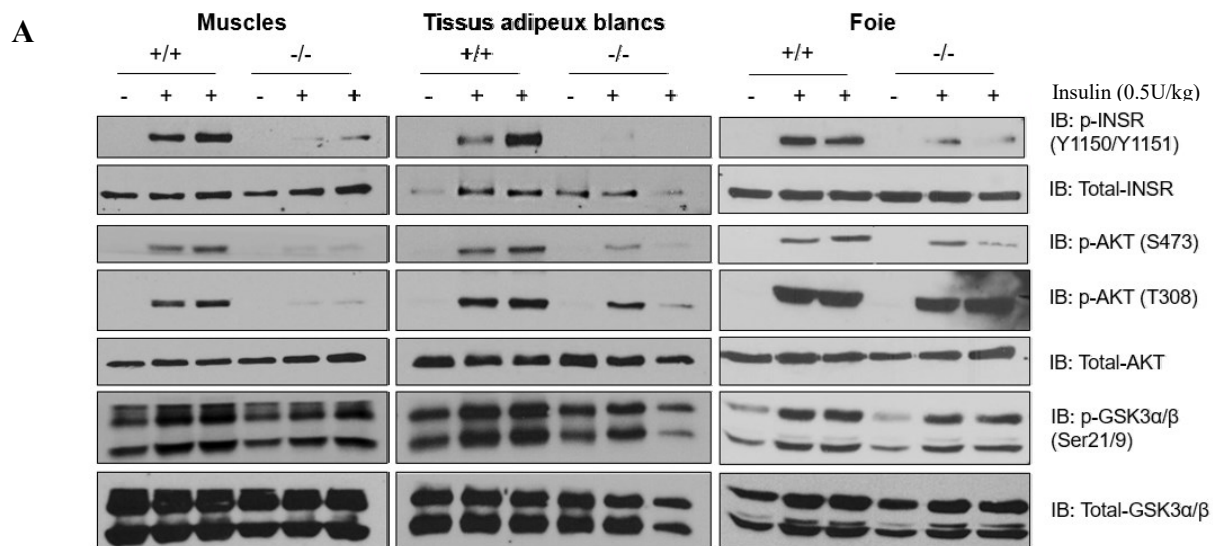


Figure 13. Signalisation de la voie de l'insuline *in vivo* dans les souris *Gas6*^{-/-} à 3 mois

(A) Immunobuvardage montrant les niveaux de phosphorylation de plusieurs kinases impliquées dans la signalisation de l'insuline, suite à une injection dans la veine cave de PBS ou de 0,5 U/kg d'insuline. (B-D) Quantifications des niveaux de phosphorylation des différentes kinases sur la quantité de protéine totale des immunobuvardages en A. (B = foie, C = gras blanc, D = muscle). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique « two-way ANOVA » représente la différence significative entre les génotypes. Le test post-hoc de Bonferroni représentent les comparaisons multiples entre les différents groupes aux différents temps : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s.=non-significatif. (n=3 PBS, 4 Ins)

4.2 Conséquences d'un gain de fonction de GAS6 sur le métabolisme du glucose *in vivo*

Dans la littérature, il est suggéré que chez l'humain, les niveaux de Gas6 sanguin sont associés avec le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline [77]. Nous avons donc voulu étudier les effets d'une augmentation des niveaux circulants de GAS6 sur le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline chez la souris. Nous avons généré deux lignées de souris transgéniques surexprimant GAS6 dans le foie. Cette stratégie a préalablement été utilisée afin de générer des modèles de souris ayant des niveaux circulants protéiques de 5 à 100 fois plus élevés que les souris de type sauvages, entre autres pour les protéines Adiponectine, FGF21 et PCSK9 [127-129]. Un autre aspect intéressant de surexprimer GAS6 dans le foie est que la γ -carboxylase est hautement active dans les cellules hépatiques, ce qui permet la γ -carboxylation de GAS6 [131].

Le vecteur utilisé pLiv.7 contient la région de contrôle hépatique du gène de l'apolipoprotéine E3 (ApoE) humaine, ce qui permet d'induire l'expression de *Gas6* spécifiquement dans les hépatocytes [127-129]. L'ADNc de GAS6 en fusion avec une étiquette « -Myc-His » a été cloné dans le vecteur en utilisant les sites de restriction pour les enzymes KpnI et XhoI. Afin de confirmer si l'ADNc s'est inséré au bon endroit, nous avons d'abord vérifié à l'aide de différentes enzymes de restriction si nous obtenions la taille attendue de fragments suite à différentes combinaisons. Le clone obtenu ainsi que le plasmide vide ont été digérés avec deux combinaisons d'enzyme de restriction : KpnI/XhoI et NotI/SpeI. Le plasmide

vide pLiv.7 a une taille de 8,5 kb et l'ADNc Gas6-Myc-His a une taille de 2 kb. Lorsque les clones sont digérés avec les enzymes KpnI et XhoI, le vecteur seul doit contenir une seule bande de taille 8,5 kb, tandis que le vecteur contenant l'ADNc doit avoir deux bandes, soit de tailles 8,5 et 2 kb. Lorsque les clones sont digérés avec les enzymes NotI et SpeI, le vecteur seul doit contenir deux bandes de tailles 5,9 et 2,6 kb, tandis que le vecteur contenant l'ADNc doit avoir deux bandes de tailles 7,9 et 2,6 kb (Figure 14, A et voir le schéma du plasmide dans la section 3.1.2 Figure 7). De cette façon, on s'assure que l'ADNc est inséré au bon endroit dans le vecteur.

Par la suite, nous avons testé la construction afin de nous assurer que la protéine GAS6 était bien produite et sécrétée. La construction ou le vecteur vide ont été transfectés dans des HuH7, une lignée de carcinome hépatocellulaire humain. Par immunobuvardage, la protéine GAS6 est détectée dans le surnageant des HuH7 transfectées avec pLiv.7-Gas6, mais pas dans celui des HuH7 transfectées avec le vecteur vide (Figure 14, C). Il est important de noter que la protéine GAS6 est détectée en utilisant un anticorps contre son tag Myc, tout au long des expériences d'immunobuvardage suivantes. Puisque les résultats obtenus tendent à montrer que la construction est fonctionnelle, elle a été utilisée afin de générer des souris transgéniques sur fond génétique C57B6/J. Lors du génotypage des souris, le produit PCR des souris transgéniques doit montrer deux bandes, soient une de taille d'environ 1 kb et une de taille 140 pb, tandis que les souris de type sauvage n'ont qu'une seule bande, soit à 1 kb. Cette bande à 1 kb est en fait le GAS6 endogène, tandis que la bande à 140 pb est le produit obtenu pour le transgène. Nous avons obtenu trois fondateurs, soit les souris #84, #13 et #701, dont un est mort avant de se reproduire (#701), nous donnant donc deux lignées distinctes : *ApoE-Gas6-84* (Figure 14, B) et *ApoE-Gas6-13*.

Par la suite, les niveaux circulant de GAS6 ont été mesurés dans le sérum des souris, à l'aide d'un ELISA commercial qui permet de mesurer la protéine GAS6 murine. Les souris de type sauvage ont en moyenne une concentration de GAS6 sérique d'environ 40 ng/mL. Les niveaux obtenus pour les deux lignées de souris transgéniques sont les suivants : environ 350 ng/mL pour la lignée #84 et 3650 ng/mL pour la lignée #13 (Figure 14, D). Nous avons donc généré des souris transgéniques ayant environ 9 et 90 fois plus de GAS6 dans le sang comparativement à des souris de type sauvages.

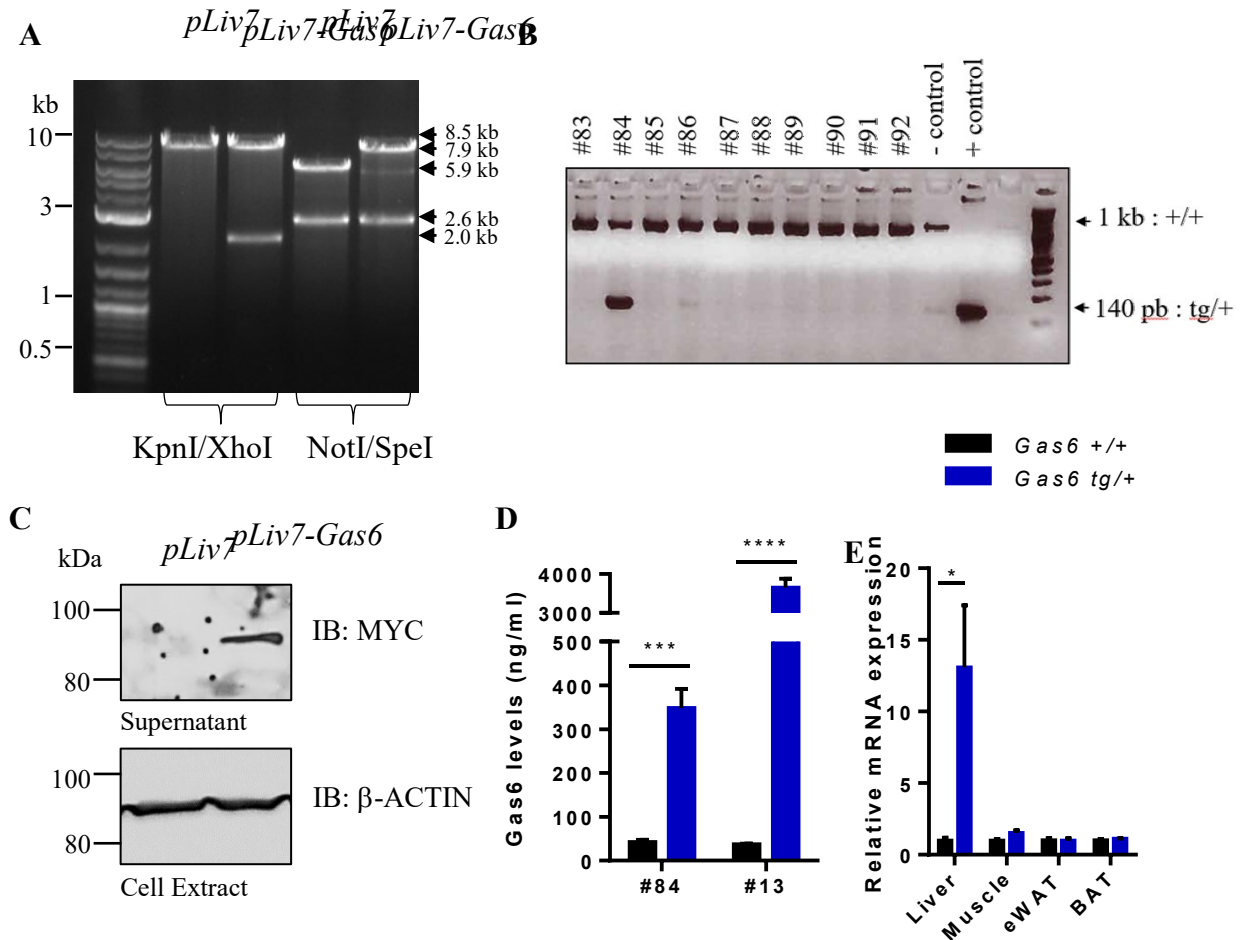


Figure 14. Génération d'un modèle de souris transgénique surexprimant GAS6 dans le foie.

(A) Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose démontrant le clonage de l'ADNc Gas6-Myc-His dans le vecteur pLiv.7. (B) Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose démontrant les produits PCR obtenues afin d'établir le génotype des souris obtenues suite à la micro-injection de l'ADN pronucléaire dans des embryons de souris. (C) Immunobuvardage du milieu de culture des cellules HuH7 transfectées transitoirement avec le vecteur vide pLiv.7 ou avec la construction pLiv.7-Gas6, démontrant la sécrétion de GAS6 dans le surnageant. (D) Niveaux de GAS6 dans le sang des deux lignées de souris transgéniques surexprimant GAS6. (E) Niveaux de GAS6 dans différents tissus de la lignée #84. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique « two-way ANOVA » représente la différence significative entre les génotypes. Le test post-hoc de Bonferroni représente les comparaisons multiples entre les différents groupes aux différents temps : * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Pour la lignée #84, nous avons aussi confirmé par qPCR que les niveaux d'ARNm de GAS6 sont 13 fois plus élevés dans le foie des souris transgéniques en comparaison avec les souris sauvages, et cette augmentation n'est pas détectée dans le muscle squelettique, le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun (Figure 14, E).

Ces résultats démontrant clairement une élévation des niveaux circulants de GAS6 dans les souris *ApoE-Gas6*, nous avons donc étudié leur phénotype métabolique afin de déterminer l'effet de cette augmentation sur le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline. Le phénotype de la première lignée obtenue, soit la lignée *ApoE-Gas6-84*, qui présente environ 9 fois plus de GAS6 circulant, a été analysé puisque la deuxième lignée a été obtenue quelques mois après la première. Au niveau de la glycémie à jeun ou non, il n'y a aucune différence significative entre les souris transgéniques et les souris sauvages à l'âge de 3 mois (Figure 15, A). Cependant, à l'âge de 6 mois, on peut remarquer que le glucose sanguin est plus élevé d'environ 12% lorsque les souris ne sont pas à jeun, et d'environ 10% lorsque les souris sont mises à jeun pour 5 heures (Figure 15, B). Ces résultats sont intéressants, puisque l'on peut observer l'inverse chez les souris déficientes en GAS6, soit que les niveaux de glucose étaient significativement plus bas lorsque les souris n'étaient pas à jeun. Au niveau de la tolérance au glucose, il n'y a pas de différence notable entre les souris transgéniques comparativement aux souris sauvages, à 3 et 6 mois (Figure 15, C et F). La sensibilité à l'insuline est cependant affectée par la surexpression des niveaux circulant de GAS6 dans tout l'organisme, aux deux âges. En effet, les souris transgéniques sont plus résistantes à l'insuline que les souris sauvages; après une injection d'insuline, le glucose sanguin est plus élevé chez les souris transgéniques (Figure 15; D, E, G, H).

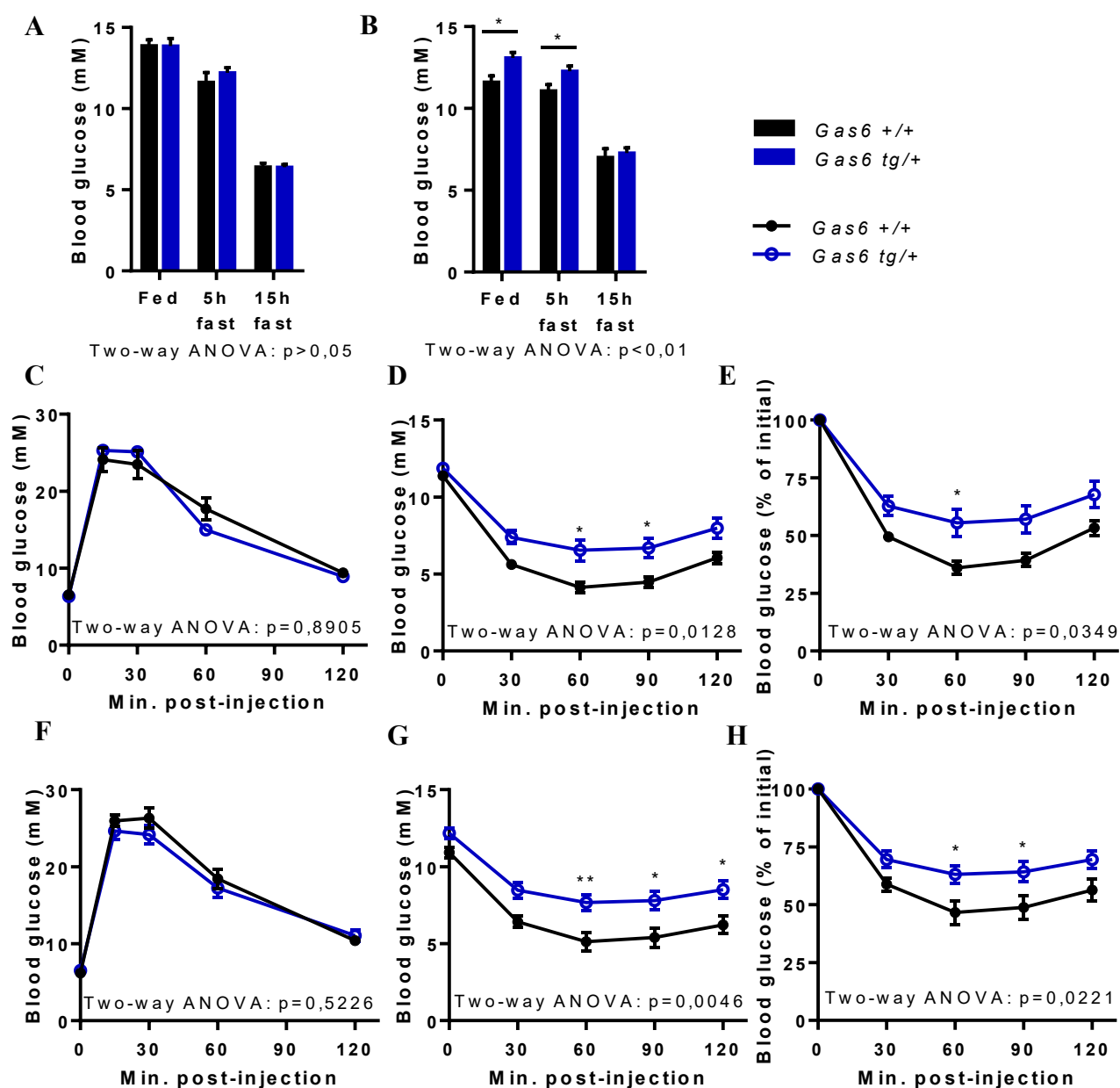


Figure 15. Phénotype métabolique des souris transgéniques surexprimant GAS6 dans le foie, sur fond génétique C57B6/J, âgées de 3 et 6 mois.

(A-B) Glucose sanguin à jeun (5-15h) ou non (postprandial). (C et F) IPGTT avec 2 g/kg de glucose, 15h de mise à jeun. (D, E, G, H) ITT avec 0,75 U/kg d'insuline, 5h de mise à jeun. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique « two-way ANOVA » représente la différence significative entre les génotypes. Le test post-hoc de Bonferonni représentent les comparaisons multiples entre les différents groupes aux différents temps : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (A, C, D, E = 3 mois; B, F, G, H = 6 mois) (n=11-19).

Donc, alors qu'en absence de GAS6, on remarque chez les souris une amélioration de la sensibilité à l'insuline, la surexpression de GAS6 induit une diminution au niveau de la sensibilité à l'insuline. Dans leur ensemble, ces résultats montrent que la protéine GAS6 joue un rôle important dans la sensibilité à l'insuline.

4.3 Conséquences d'une perte de fonction de GAS6 dans un modèle de résistance à l'insuline (HFD) *in vivo*

Dans la littérature, il est suggéré que les niveaux de GAS6 sanguins seraient en corrélation avec l'obésité, l'inflammation et la résistance à l'insuline [77]. De plus, une étude effectuée avec un inhibiteur pharmacologique du récepteur AXL a montré que le traitement de souris avec cette molécule prévient la prise de poids lorsque les souris sont mises sur une diète riche en gras (HFD) [124]. Par ailleurs, les études effectuées dans notre laboratoire montrent que lorsque la protéine GAS6 est absente dans l'organisme, il y a une amélioration de la sensibilité à l'insuline lorsque les souris sont sur une diète normale (ND). Puisque GAS6 affecte la sensibilité à l'insuline, nous avons voulu déterminer si la déficience en GAS6 pouvait protéger les souris dans un modèle d'obésité accompagné d'une résistance à l'insuline et d'une intolérance au glucose induit par une diète riche en gras. La HFD est un modèle utilisé pour des études de métabolisme puisque les souris deviennent obèses et développent une intolérance au glucose et à l'insuline après quelques semaines de diète : elles présentent donc une condition métabolique semblable au prédiabète de type 2.

L'analyse phénotypique de ce modèle d'obésité a d'abord été effectuée sur les souris *Gas6*^{-/-} sur fond génétique FVB. Au début de la diète, les souris pesaient environ 25 g, et après 12 semaines de diète, les souris sauvages pesaient en moyenne 35 g. Après 12 semaines de diète, aucune différence de poids n'a été observée entre les souris *Gas6*^{+/+} et *Gas6*^{-/-} (Figure 16, A-B). La tolérance au glucose n'est pas affectée par la déficience en GAS6 lorsque les souris sont sur une HFD (Figure 16, C), comparativement aux souris sur une diète normale, où l'on pouvait voir une amélioration de la tolérance au glucose suite à un bolus de 2 g/kg de glucose.

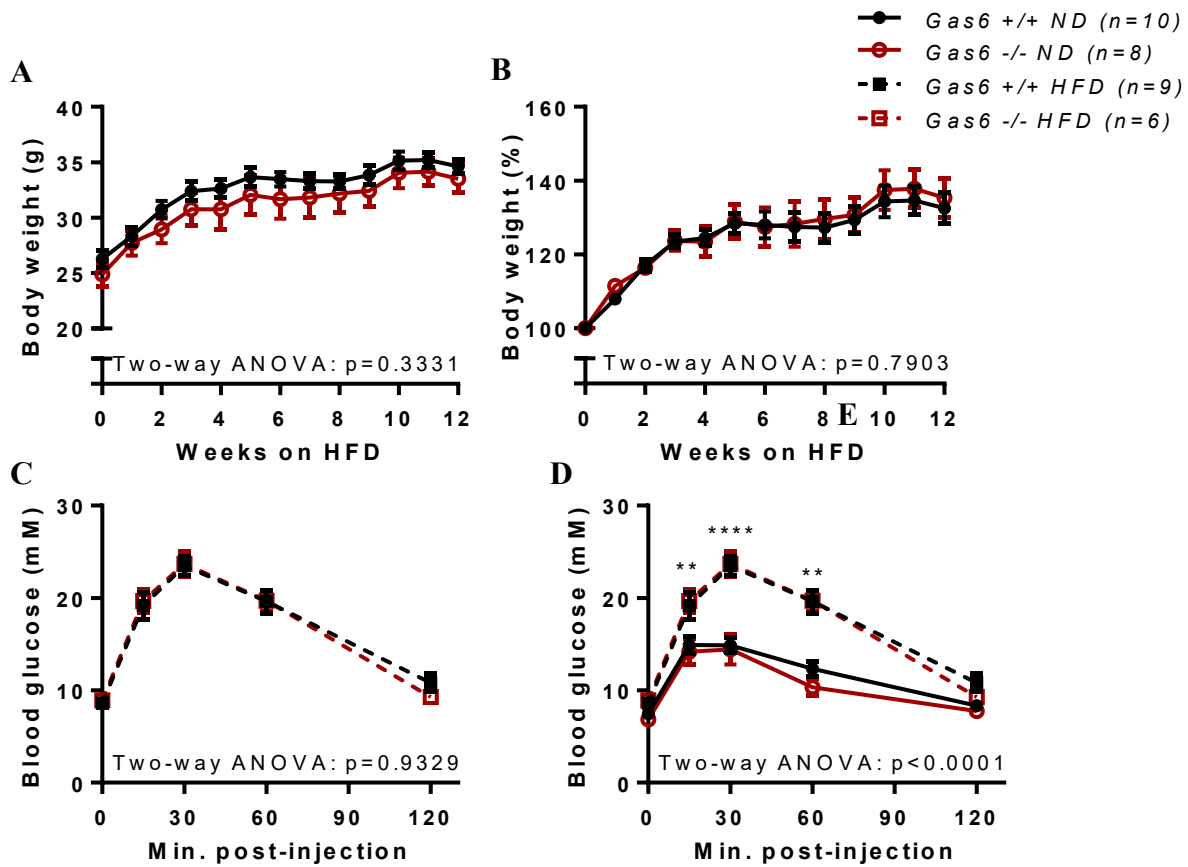


Figure 16. Phénotype métabolique des souris déficientes en GAS6 sur fond génétique FVB sur une diète riche en gras.

(A) Courbe de la prise de poids des souris durant 12 semaines. (B) Courbe de la prise de poids des souris durant 12 semaines (en pourcentage de poids initial). (C) IPGTT avec 1 g/kg de glucose, 6h de mise à jeun. (D) Comparaison de la tolérance au glucose entre les souris sur une diète normale et une diète riche en gras. ($n=9-6$). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique « two-way ANOVA » représente la différence significative entre les génotypes. Le test post-hoc de Bonferroni représente les comparaisons multiples entre les différents groupes aux différents temps : ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$.

Cependant, on peut constater que la diète a induit une intolérance au glucose si l'on compare les niveaux sanguins de glucose après un bolus de glucose (Figure 16, D).

Malgré cette diminution de la tolérance au glucose, les souris sont à seulement 135% leur poids initial après 12 semaines. Dans une étude comparative effectuée sur des souris

C57B6/J et FVB, les résultats ont montré que les souris FVB sont résistantes à l'induction d'une obésité induite par une HFD [130]. En comparant la prise de poids des souris FVB de type sauvage de cette expérience avec des souris pures C57B6/J, il est possible de constater qu'effectivement, les souris C57B6/J prennent beaucoup plus de poids lorsqu'elles sont sur une HFD (Figure 17). L'expérience a donc été répétée sur une cohorte de souris *Gas6*^{-/-} sur fond génétique C57B6/J en utilisant une diète ayant un pourcentage plus élevé de gras (60% au lieu de 45%).

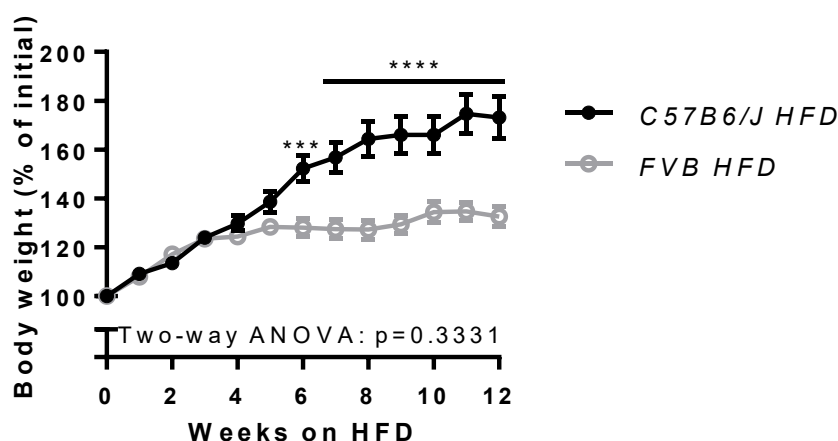


Figure 17. Analyses comparatives entre les souris de type sauvage de fond génétique FVB ou C57B6/J.

Courbe de prise de poids des souris de type sauvage de deux fonds génériques différents sur une diète riche en gras (45%) (n=5-9). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique « two-way ANOVA » représente la différence significative entre les génotypes. Le test post-hoc de Bonferroni représente les comparaisons multiples entre les différents groupes aux différents temps : ***p<0,001; ****p<0,0001.

Comme pour les souris sur fond FVB, le poids initial ainsi que le poids tout au long de la diète ne diffère pas chez les souris *Gas6*^{-/-} sur fond génétique C57B6/J (Figure 18, A-B). Cependant, les souris *Gas6*^{-/-} ont une meilleure tolérance au glucose que les souris de type sauvages lorsqu'elles sont sur une HFD (Figure 18, C). De plus, suite à un bolus d'insuline, les souris déficientes en GAS6 ont un glucose sanguin plus bas, donc les souris semblent plus sensibles à l'insuline, comme ce qui est observé chez les souris sur une diète normale (Figure 18, D-E).

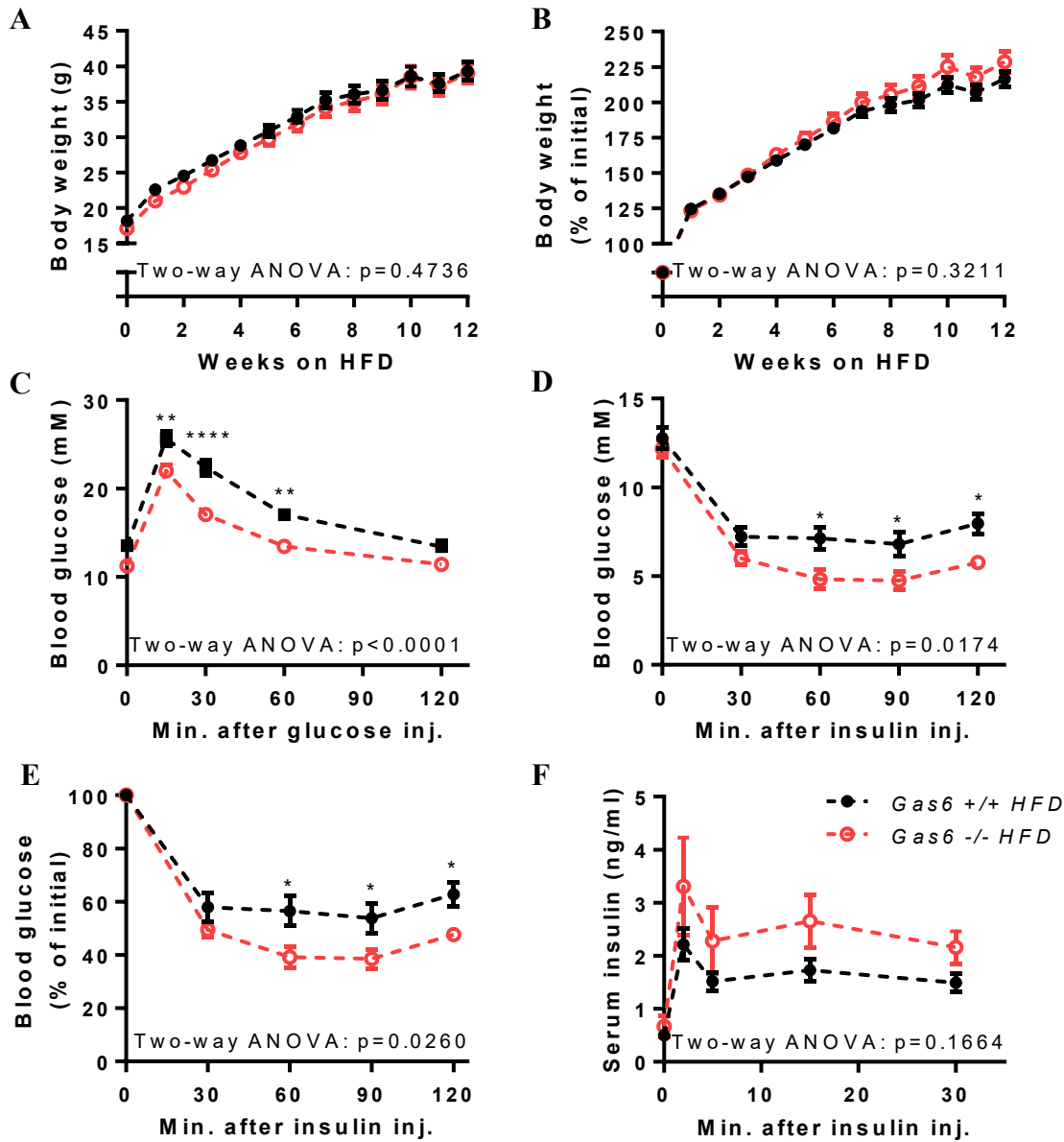


Figure 18. Phénotype métabolique des souris déficientes en GAS6 sur fond génétique FVB sur une diète riche en gras.

(A) Courbe de la prise de poids des souris durant 12 semaines (n=12-11). (B) Courbe de la prise de poids des souris durant 12 semaines (en pourcentage de poids initial). (C) IPGTT avec 1 g/kg de glucose, 6h de mise à jeun. (D-E) ITT avec 0,75 U/kg d'insuline, 5h de mise à jeun. (F) GSIS avec 3 g/kg de glucose, 15h de mise à jeun (n=11-10). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique « two-way ANOVA » représente la différence significative entre les génotypes. Le test post-hoc de Bonferroni représente les comparaisons multiples entre les différents groupes aux différents temps : ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$.

Au niveau de la sécrétion d'insuline, il n'y a aucune différence significative entre les souris *Gas6*^{+/+} et *Gas6*^{-/-} (Figure 18, F). Donc, au niveau des souris sur fond génétique C57B6/J, on voit une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline lorsqu'elles sont nourries avec une diète riche en gras.

En comparant les données des analyses métaboliques obtenues avec les souris sur une diète normale et une diète riche en gras, on peut observer que les souris *Gas6*^{-/-} sur HFD semblent protégées contre l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline induite par la diète (Figure 19).

En effet, après 6 heures de mise à jeun, on remarque que les souris déficientes en GAS6 sur HFD ont une glycémie de 11,3 mM, ce qui est équivalent à celle des souris de type sauvages, soit 11,3 mM (Figure 19, A). De plus, lors des tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline, les concentrations de glucose sanguin des souris *Gas6*^{-/-} sur HFD sont équivalentes, sinon un peu plus faibles que les souris *Gas6*^{+/+} sur ND (Figure 19, B-C). Suite à une IRM, on peut constater que les souris sur HFD ont moins de masse musculaire (environ 15% de moins) et environ deux fois plus de masse grasseuse (passant d'environ 12% à 26%) que les souris sur une ND (Figure 19, D-E). Ces souris ont aussi environ 4 fois plus de tissus adipeux blanc épидидymal que les souris sur ND (Figure 19, F). La déficience en *Gas6* n'a pas d'effet significatif sur la masse musculaire et la masse grasseuse.

En résumé, l'absence de GAS6 augmente la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline sans affecter la sécrétion d'insuline induite par un bolus intrapéritonéal de glucose. Paradoxalement, au niveau moléculaire, les *Gas6*^{-/-} montrent une diminution de la signalisation de l'insuline dans le foie, muscle et le tissu adipeux. Les souris déficientes en GAS6 semblent protégées de la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose induite par une diète riche en gras. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la signalisation par GAS6 et ses récepteurs influence probablement la sensibilité à l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux, selon un mécanisme encore inconnu.

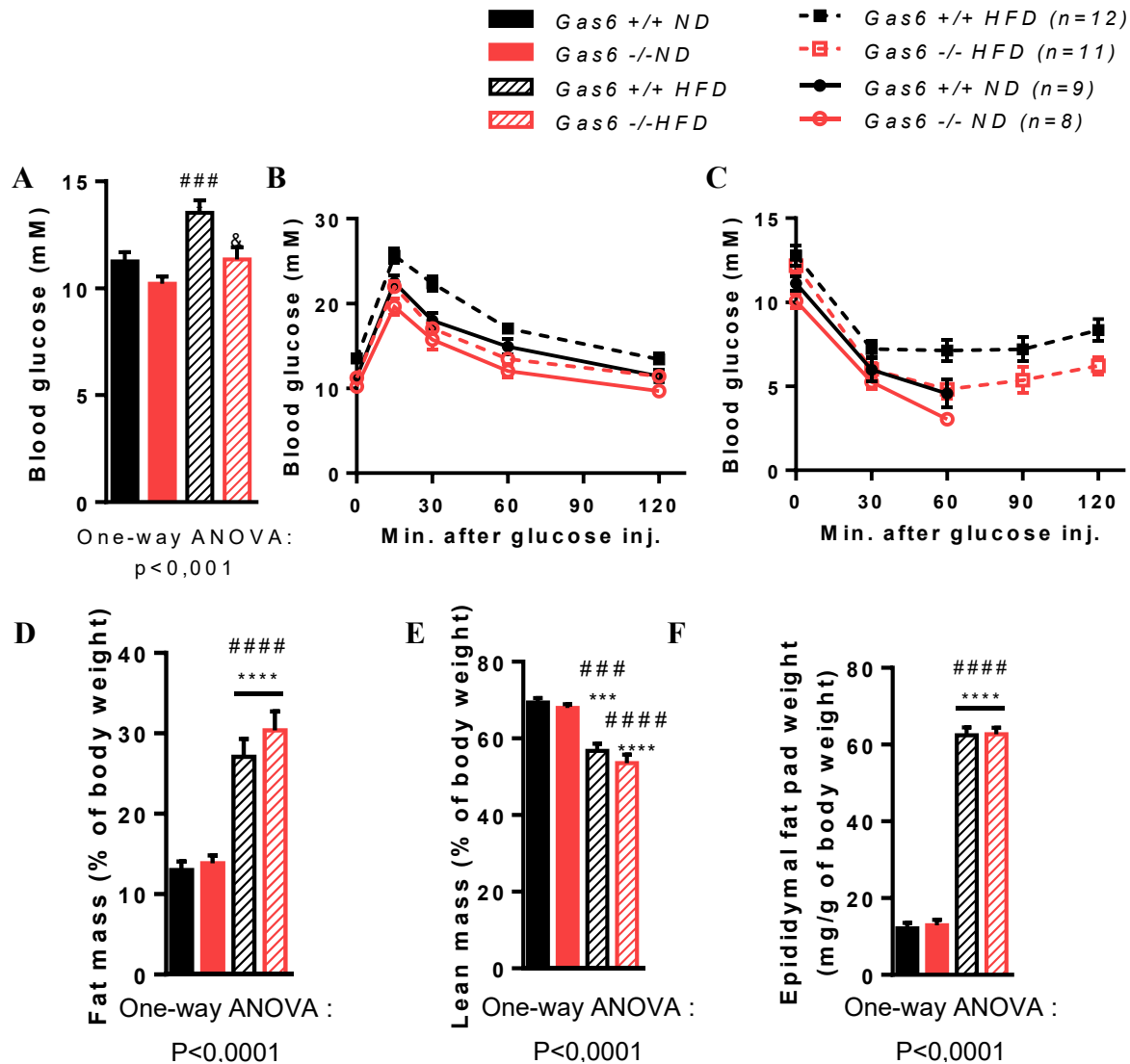


Figure 19. Analyses comparatives des phénotypes métaboliques des souris $Gas6^{-/-}$ sur fond C57B6/J mises sur une diète normale ou une diète riche en gras, pendant 12 semaines.

(A) Glucose sanguin 6h à jeun. (B) IPGTT avec 1 g/kg de glucose, 6h de mise à jeun. (C) ITT avec 0,75 U/kg d'insuline, 5h de mise à jeun. (D-E) Masse musculaire et masse adipeuse mesurées à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et exprimées en pourcentage de poids total de la souris. (F) Masse des tissus adipeux blancs de l'épididyme, évaluée lors de la dissection. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique « two-way ANOVA » représente la différence significative entre les génotypes. Le test post-hoc de Bonferroni représente les comparaisons multiples entre les différents groupes aux différents temps : * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ****, $P < 0,0001$ comparé avec le groupe $Gas6^{+/+} ND$. ###, $P < 0,001$; ####, $P < 0,0001$ comparé avec le groupe $Gas6^{-/-} ND$.

4.4 Déterminer si la signalisation dépendante de GAS6 est présente et fonctionnelle dans les cellules sensibles à l'insuline

Suite aux résultats *in vivo* récoltés à l'aide des analyses métaboliques chez la souris, il semblerait que la protéine GAS6 joue un rôle au niveau du métabolisme du glucose et/ou de la sensibilité à l'insuline. Afin d'étudier la signalisation dépendante de GAS6, il était d'abord primordial de déterminer dans quels tissus on retrouve le gène de *Gas6* et de ses récepteurs. Nous avons donc établi le patron d'expression de ces gènes en analysant les niveaux d'ARN de *Gas6* et ses récepteurs dans les différents tissus, et plus particulièrement dans les tissus sensibles à l'insuline.

Le gène *Gas6* est hautement exprimé dans le muscle, soit au moins 2,5 fois plus exprimé que dans les tissus adipeux blancs et bruns ainsi que le foie, tous des tissus sensibles à l'insuline. On le retrouve aussi dans le rein, les ostéoblastes, la calvaria, les poumons, les testicules ainsi que le cerveau (Figure 20, A). Le gène *Axl* est exprimé le plus fortement dans le muscle, suivi des tissus adipeux blanc et brun, pour ce qui est des tissus sensibles à l'insuline. On le retrouve aussi dans les testicules, les poumons, les ostéoblastes ainsi que dans le cerveau (Figure 20, B). Le gène *Tyro3* est exprimé dans les testicules et le cerveau (Figure 20, C). Le gène *Mertk* est exprimé fortement dans le rein, suivi du foie et de l'intestin. On le retrouve moins fortement exprimé dans le tissu adipeux blanc, les poumons et le cerveau (Figure 20, D).

Nous avons poussé plus loin l'analyse d'expression de *Gas6* et ses récepteurs dans différents types de muscle et de tissu adipeux. Le muscle gastrocnémien (Gast.), le muscle soléaire et le plantaris se retrouvent à l'arrière de la jambe inférieure, tandis que le tibial antérieur et le muscle long extenseur des orteils se retrouvent devant de la jambe inférieure. Les tissus adipeux analysés sont le gras brun, le tissu adipeux blanc épididymal et le tissu adipeux blanc sous-cutané. D'abord, au niveau des récepteurs de GAS6, on remarque qu'*Axl* est le récepteur le plus exprimé dans tous ces tissus, comparativement à *Mertk* et *Tyro3*. Il est plus fortement exprimé dans le muscle soléaire, et dans le eWAT et sWAT de façon similaire (Figure 21, A-B). Le gène *Gas6* est plus fortement exprimé dans le muscle soléaire et le plantaris, et le eWAT pour ce qui est du tissu adipeux (Figure 21, C-D).

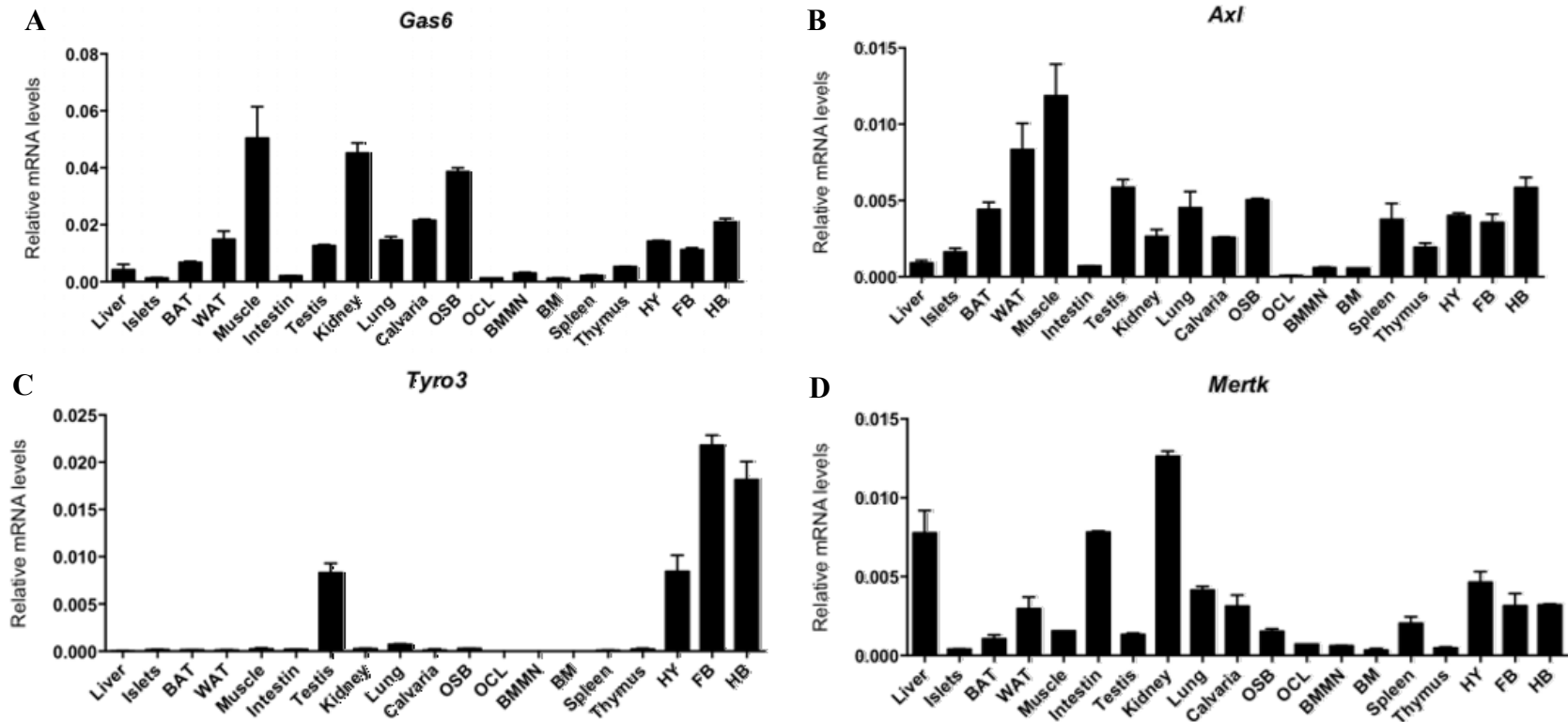


Figure 20. Expression de *Gas6* et ses récepteurs dans différents tissus

L'expression des gènes a été analysée par qPCR dans divers tissus de souris et les niveaux d'ARNm ont été normalisés sur la β -actine. (A) *Gas6*. (B) *Axl*. (C) *Tyro3*. (D) *Mertk*. BAT : tissu adipeux bruns, WAT : tissu adipeux blancs, OSB : ostéoblastes, OCL : ostéoclastes, BM : moelle osseuse, HY : hypothalamus, FB : *forebrain*, HB : *hindbrain*. (*Données obtenues par le Dre Julie Lacombe). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM.

Une conclusion intéressante peut être tirée de ces patrons d'expression : les gènes *Gas6* et *Axl* ont toujours un patron d'expression très similaire, tant au niveau de différents tissus de l'organisme, mais aussi au niveau de l'expression des différents types de muscles et de tissus adipeux.

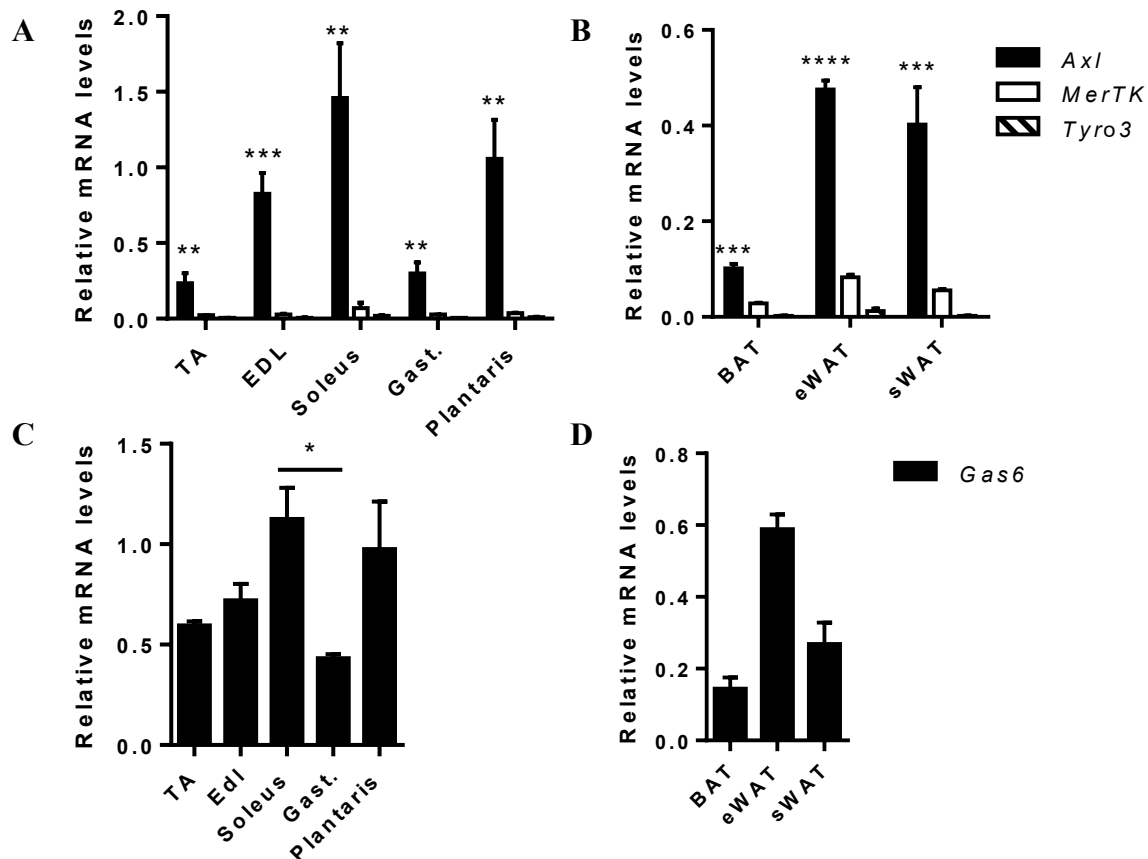


Figure 21. Expression de *Gas6* et ses récepteurs dans différents types de muscle et de tissus adipeux de souris sur fond C57B6/J

L'expression des gènes a été analysée par qPCR dans différents types de muscles et de tissus adipeux chez la souris et les niveaux d'ARNm ont été normalisés sur les niveaux d'ARN du gène *Hprt*. (A) Expression des récepteurs de *Gas6* dans différents types de muscles. (B) Expression des récepteurs de *Gas6* dans différents types de tissus adipeux. (C) Expression de *Gas6* dans différents types de muscle. (D) Expression de *Gas6* dans différents types de gras. TA : tibial antérieur, EDL : muscle long extenseur des orteils, Soleus : muscle soléaire, Gast. : muscle gastrocnémien, BAT : tissu adipeux bruns, eWAT : tissus adipeux blanc épидидymal, sWAT : tissu adipeux blanc sous-cutané. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique « two-way ANOVA » représente la différence significative entre les génotypes. Le test post-hoc de Bonferroni représente les comparaisons multiples entre les différents groupes aux différents temps : * $p < 0,05$

Suite à ces observations, nous avons décidé de concentrer l'étude sur le muscle puisque le gène *Gas6* est exprimé le plus fortement dans ce tissu et de plus, le muscle est responsable d'éliminer 80% du glucose sanguin en réponse à l'insuline [132].

Afin d'étudier la signalisation de Gas6 et ses récepteurs *in vitro*, les C2C12, une lignée cellulaire de myoblastes murins pouvant se différencier en myotubes, ont servi de modèle cellulaire. Selon l'expression des gènes, le gène *Axl* est le récepteur de GAS6 le plus fortement exprimé dans ces cellules, ce qui va dans le même sens que ce qui a été observé dans le muscle squelettique des tissus de souris (Figure 22).

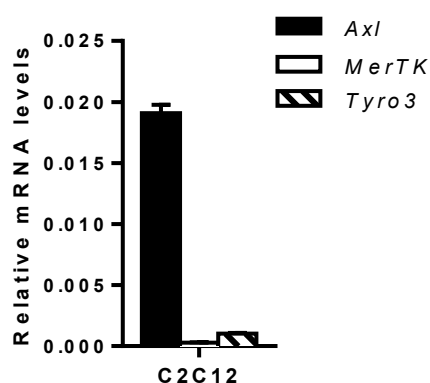


Figure 22. Expression des récepteurs de Gas6 dans le modèle cellulaire de muscle, les C2C12.

L'expression des gènes a été analysée par qPCR dans les C2C12 différenciées et les niveaux d'ARNm ont été normalisés sur les niveaux d'ARNm de la β -actine.

Puisque AXL est le récepteur de GAS6 étant hautement exprimé dans le muscle, nous avons réalisé l'étude de la signalisation de GAS6 en ciblant ce récepteur. Afin d'étudier cette voie de signalisation, des clones stables de HEK 293, contenant le plasmide dans lequel l'ADNc Gas6-Myc-His a été inséré, ou le plasmide vide, ont été utilisés. Le surnageant de ces cellules est utilisé, puisque la protéine GAS6 est une protéine sécrétée. La protéine GAS6 est détectée par immunobuvardage dans le surnageant des cellules HEK 293 ayant le plasmide contenant l'ADNc Gas6-Myc-His et n'est pas détectée dans le surnageant des HEK 293 ayant seulement le plasmide vide (Figure 23, A). Par la suite, le surnageant a été produit en présence de vitamine

K ou de Warfarine, un inhibiteur de VKOR, afin de déterminer si la protéine GAS6 est carboxylée, ce qui a été détecté en utilisant un anticorps reconnaissant les protéines Gla. En présence de vitamine K, on remarque que la protéine GAS6 semble plus carboxylée que lorsqu'elle est produite sans vitamine K, suggérant que la carboxylation de la protéine est grandement augmentée en présence de vitamine K. Lorsque l'on ajoute la warfarine, la carboxylation est totalement inhibée (Figure 23, B).

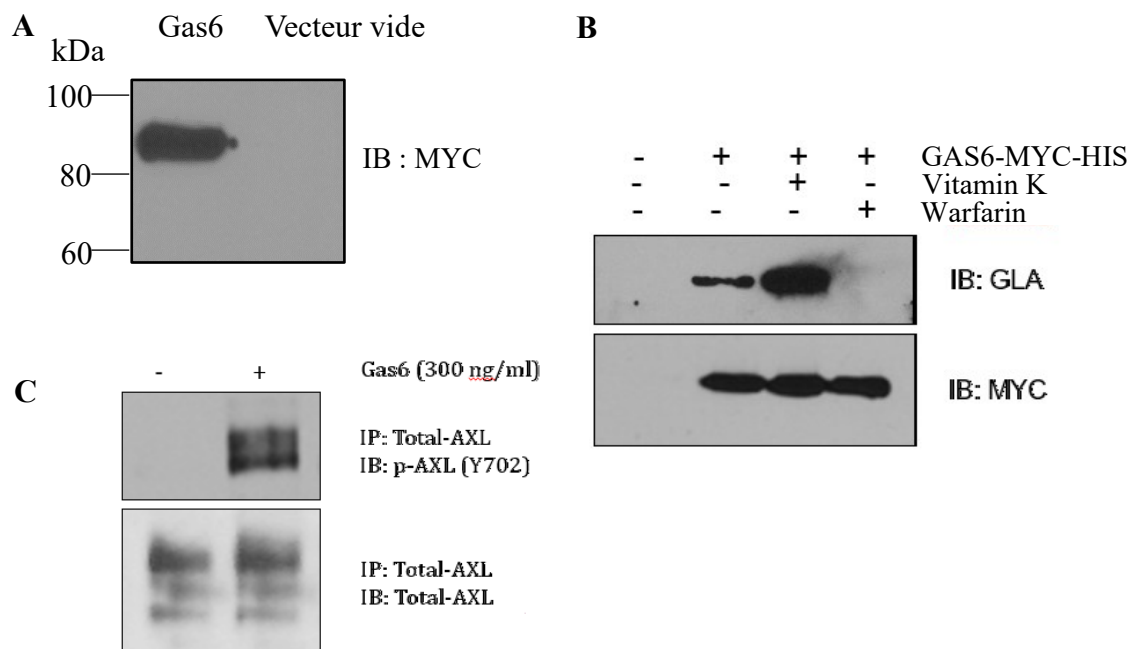


Figure 23. Production du surnageant GAS6 dans des clones stables HEK293 et phosphorylation dépendante de GAS6 du récepteur AXL

(A) Immunobuvardage de la production de la protéine GAS6 dans le surnageant de cellules HEK 293. (B) Immunobuvardage démontrant les niveaux de carboxylation de la protéine GAS6 produite dans le surnageant des cellules HEK 293. (C) Immunobuvardage démontrant la phosphorylation du récepteur AXL dans les C2C12 en présence de la protéine recombinante GAS6.

Le milieu contenant la protéine recombinante, ainsi que le milieu contrôle, sont utilisés pour traiter les cellules C2C12 différenciées. En présence du milieu contenant la protéine GAS6 carboxylée, on remarque une phosphorylation du récepteur AXL, qui n'est pas visible lorsque

les cellules sont traitées avec le surnageant contrôle (Figure 23, C). Cette expérience permet de déterminer que le récepteur AXL est présent et fonctionnel dans les C2C12, et qu'il y a une phosphorylation du récepteur dépendante de GAS6. Ces cellules représentent donc un bon modèle d'étude pour analyser la signalisation dépendante de GAS6 au niveau des cellules musculaires.

Dans la littérature, deux inhibiteurs pharmacologiques de la voie de signalisation GAS6-TAM récepteurs ont été caractérisés. Le R428 est une petite molécule pharmacologique qui inhibe spécifiquement le récepteur AXL [133]. Les premières études ont montré que le R428 bloque les activités catalytiques et procancéreuses d'AXL, et inhibe ainsi les événements dépendants d'AXL, y compris la phosphorylation d'AKT [133]. Encore plus intéressant, des études ont montré que le traitement de souris avec cette molécule prévient la prise de poids lorsque les souris sont mises sur une diète riche en gras, sans affecter la prise de nourriture [124]. Le LDC1267 est une molécule qui permet d'inhiber sélectivement les récepteurs de la famille TAM, soit TYRO3, AXL et MERTK [134]. Cet inhibiteur a été testé *in vivo*, et les résultats ont montré qu'il pouvait mener à une réduction des métastases dépendantes des cellules NK. Les expériences *in vivo* effectuées avec ces deux inhibiteurs étant encourageantes, nous avons testé ceux-ci sur des C2C12 différenciées, afin de voir s'ils inhibent la phosphorylation d'AXL et d'AKT induite par GAS6.

En ce qui concerne le R428, on remarque une diminution de la phosphorylation d'AKT en réponse à une stimulation par Gas6, à une concentration de 5 μ M, et cette phosphorylation est presque complètement inhibée avec une concentration de 10 μ M. Cependant, plus la concentration de R428 augmente, plus la phosphorylation d'AXL induite par GAS6 est élevée, ce qui est inattendu (Figure 24, A). Il serait intéressant de regarder les niveaux de phosphorylation des autres résidus tyrosine du récepteur d'AXL, afin de voir si le résultat est similaire. Pour sa part, le LDC1267 inhibe complètement la phosphorylation d'AXL et d'AKT en réponse à GAS6 à une concentration de 5 μ M (Figure 24, B).

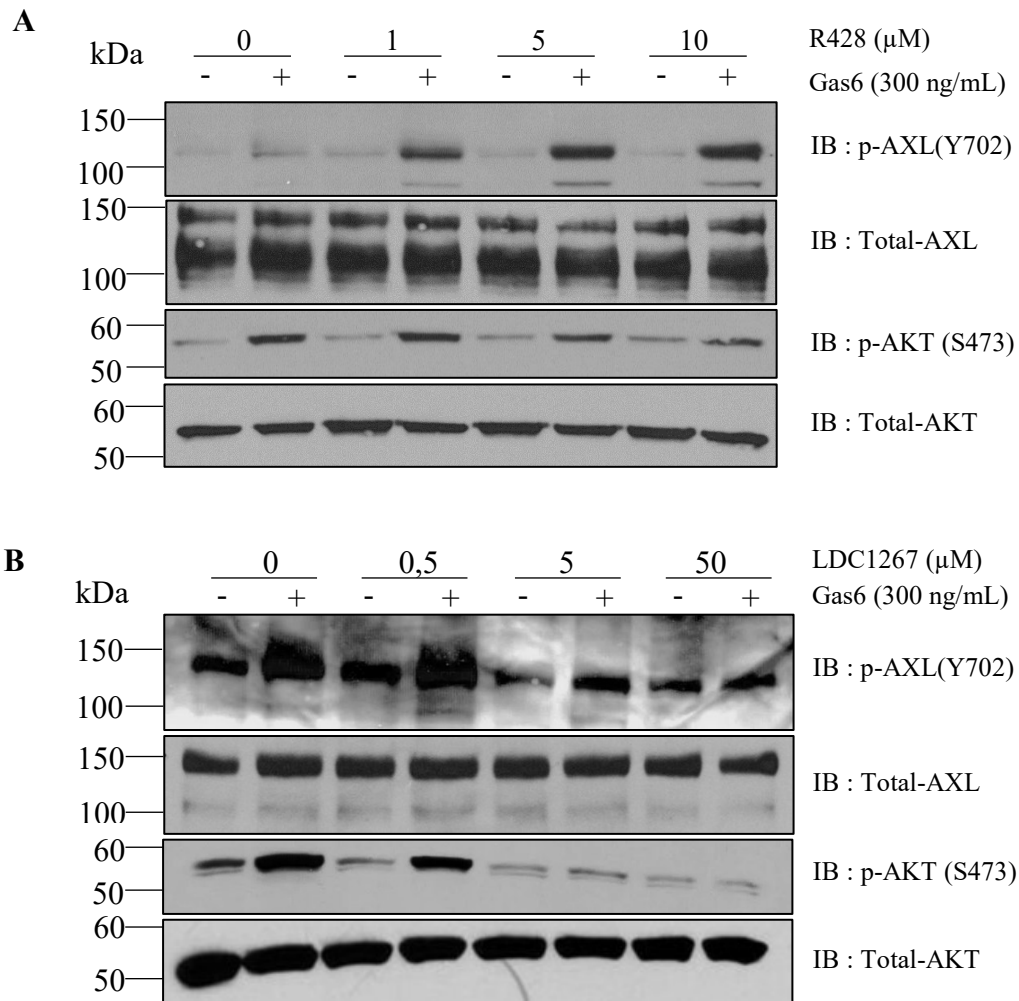


Figure 24. Inhibition de la phosphorylation dépendante de GAS6 des récepteurs AXL et AKT avec deux inhibiteurs pharmacologiques, R428 et LDC1267.

(A) Traitement de C2C12 différenciées avec GAS6 et l'inhibiteur pharmacologique R428.

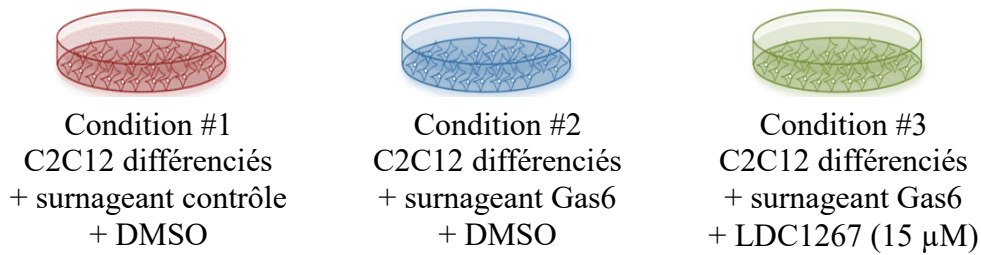
(B) Traitement de C2C12 différenciées avec GAS6 et l'inhibiteur pharmacologique LDC1267.

4.5 La signalisation induite par GAS6 dans les cellules sensibles à l'insuline

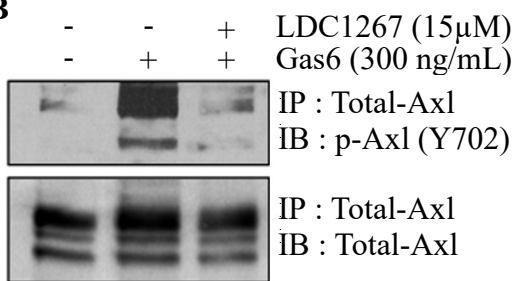
Afin d'approfondir les connaissances sur la façon dont GAS6 peut moduler la sensibilité à l'insuline dans le muscle, nous avons investigué les événements transcriptionnels en aval de la signalisation GAS6-récepteurs TAM dans les myotubes. L'expérience de séquençage d'ARN a été effectuée avec 3 conditions : le traitement des cellules avec du GAS6 recombinant ou non, en présence ou en l'absence d'un inhibiteur des récepteurs TAM, le LDC1267 (Figure 25, A). Cette expérience permettra d'avoir une vue d'ensemble de gènes qui seraient dépendant de la signalisation GAS6- récepteurs TAM, et ainsi nous éclairer sur le mode de fonctionnement de cette signalisation. En parallèle de l'expérience de séquençage d'ARN, des C2C12 ont été traitées de la même façon, mais le traitement a été fait pour 15 minutes afin d'assurer le fonctionnement des conditions de l'expérience. Par immunoprécipitation avec l'anticorps AXL total suivi d'un immunobuvardage avec l'anticorps contre AXL phosphorylé (Y702), on remarque que dans la condition avec le GAS6 recombinant, il y a une phosphorylation du récepteur, qui est inhibée dans la condition avec GAS6 et le LDC1267. De cette façon, on peut conclure que les conditions de l'expérience de séquençage d'ARN ont bien fonctionné.

Après une analyse bio-informatique, nous avons regroupé les 500 premiers gènes modifiés significativement entre Gas6 et l'inhibiteur LDC1267 dans une analyse ontologique des gènes. Cette condition permet de voir l'effet de Gas6 dépendant de ses récepteurs. Plusieurs voies impliquées dans le cancer ou le cycle cellulaire sont modifiées ou affectées par Gas6 dépendamment de ses récepteurs. Par exemple, on remarque une régulation négative de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, le cancer de la prostate, la signalisation de p53 causée par Gas6/LDC1267. Cela est attendu puisqu'il a déjà été démontré que Gas6 joue un rôle dans le cancer [84, 93]. Fait intéressant, la deuxième voie qui a le plus grand nombre de gènes modifiés de manière significative est la voie de signalisation de l'insuline (Tableau VI).

A



B



C

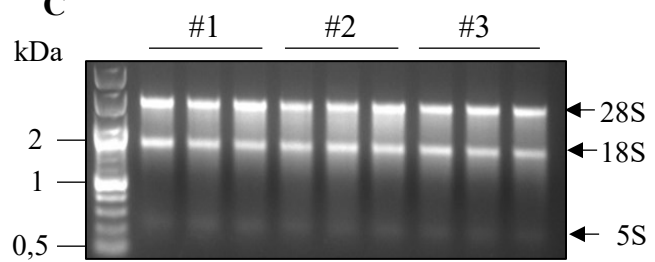


Figure 25. Expérience de séquençage d'ARN sur des myotubes traités avec GAS6 et/ou l'inhibiteur

(A) Conditions du séquençage d'ARN. (B) Immunoprécipitation AXL total suivi d'un immunobuvardage contre AXL phosphorylé en Y702, montrant le niveau de phosphorylation d'AXL sur la tyrosine 702 dans les conditions de séquençage d'ARN. (C) Électrophorèse d'ARN sur gel d'agarose démontrant le produit d'extraction d'ARN.

Rétrospectivement, suite à une analyse ontologique des gènes, nous avons analysé tous les gènes importants qui étaient modifiés soit par Gas6 ou l'inhibiteur dans la signalisation de l'insuline, afin d'avoir une vue d'ensemble de l'effet Gas6 sur cette voie de signalisation.

En effet, plusieurs régulateurs ou effecteurs de cette voie sont modifiés au niveau de l'expression génique, y compris les sous-unités régulatrices de la kinase PI3 (*Pi3kr3*, *Pik3r2*, *Pi3r1*) et de la kinase AKT (*Akt2*). Flotiline 1 et 2 (*Flot1* et *Flot2*) sont également modifiés, étant impliqué dans la régulation du transporteur de glucose GLUT4 qui est important pour le transport du glucose dans les muscles et *Irs2*, qui est une cible en aval du récepteur d'insuline.

Une autre cible intéressante serait le gène *Eif4ebp1*, qui a été précédemment démontré pour jouer un rôle important dans la régulation de la sensibilité à l'insuline. Le double KO de *Eif4ebp1* et *Eif4ebp2* démontrent une résistance à l'insuline, associée à une augmentation de l'activité de S6K.

Tableau VI. Voies de signalisation affectées par la signalisation Gas6-récepteurs TAM

<i>KEGG pathways</i>	Nombre de gènes	P-value	Benjamini
<i>Pathways in cancer</i>	18	3,75e-3	5,6e-2
<i>Insulin signaling</i>	13	2,1e-4	6,3e-3
<i>MAPK signaling</i>	12	8,0e-2	4,5e-1
<i>Focal adhesion</i>	11	3,1e-2	2,6e-1
<i>Steroid biosynthesis</i>	10	8,1e-11	9,9e-9
<i>Cell cycle</i>	10	5,6e-3	7,3e-2
<i>mTOR signaling</i>	7	2,5e-3	4,3e-2

* L'analyse KEGG a été faite avec les 500 premiers gènes qui ont changé significativement entre les conditions Gas6 et Gas6/LDC1267 dans le séquençage d'ARN

Suite à ces observations, nous avons analysé l'expression de certains de ces gènes *in vivo* dans les muscles gastrocnémiens de souris déficientes en Gas6, sur fond génétique C57B6/J, tels *Insig1*, *Irs2* et *Eif4ebp1* (Figure 26). Selon les résultats du séquençage d'ARN, le gène *Insig1* était régulé positivement dans la condition de C2C12 traitées avec du surnageant Gas6 et l'inhibiteur LDC1267, mais n'était pas changé dans la condition de C2C12 contenant seulement du surnageant Gas6. Dans le muscle gastrocnémien des souris *Gas6*^{-/-}, il n'y a pas de différence significative au niveau d'*Insig1* comparativement aux souris de type sauvages (Figure 26, A).

Pour les gènes *Irs2* et *Eif4ebp1*, dans l'expérience de séquençage d'ARN, l'expression des gènes diminue significativement dans la condition de C2C12 traitées avec du surnageant Gas6 comparativement à la condition contrôle, et augmente significativement dans la condition de C2C12 traitées avec du surnageant Gas6 et l'inhibiteur comparativement à la condition contenant seulement du surnageant. Donc, ces gènes semblent être régulés négativement par Gas6 de façon dépendante aux récepteurs TAM. *In vivo*, on remarque une augmentation significative de l'expression relative des gènes dans le muscle gastrocnémien des souris *Gas6*^{-/-} comparativement aux souris *Gas6*^{+/+}, ce qui va dans le même sens que les résultats obtenus par les expériences utilisant le séquençage d'ARN (Figure 26, B et C). Ces gènes étant impliqués entre autres dans la voie de signalisation de l'insuline, cette analyse transcriptomique suggère que Gas6 pourrait moduler cette voie au niveau de la transcription dans le muscle ou affecter la stabilité des ARNm.

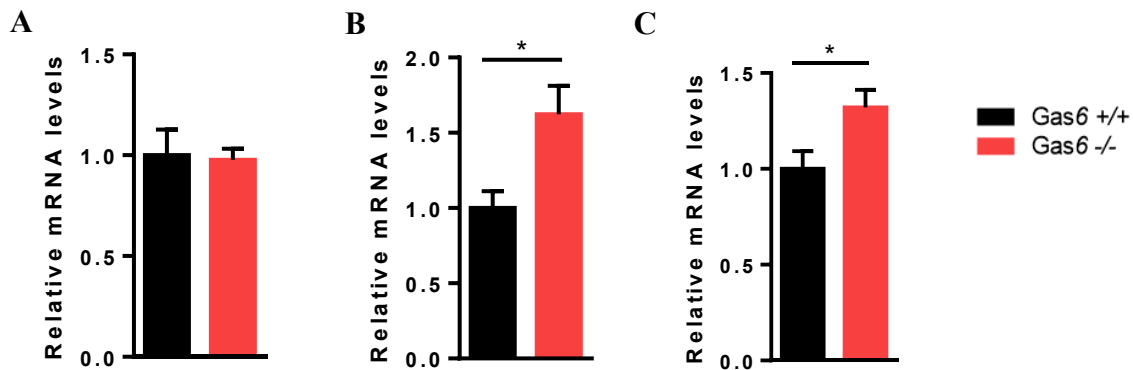


Figure 26. Expression de gènes de la signalisation de l'insuline régulés par la signalisation de Gas6-récepteurs TAM dans l'expérience de séquençage d'ARN dans des muscles gastrocnémiens

L'expression des gènes a été analysée par qPCR dans des muscles gastrocnémiens de souris *Gas6*^{+/+} et *Gas6*^{-/-} de fond génétique C57B6/J et les niveaux d'ARNm ont été normalisés sur la β -actine. (A) *Insig1*. (B) *Irs2*. (C) *Eif4ebp1*. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique « two-way ANOVA » représente la différence significative entre les génotypes. Le test post-hoc de Bonferroni représente les comparaisons multiples entre les différents groupes aux différents temps : * $p < 0,05$.

Il est important de mentionner que d'autres voies de signalisation pouvant jouer un rôle au niveau de la sensibilité à l'insuline semblent modifiées de façon dépendante de Gas6 et de ses récepteurs, cependant l'analyse doit être approfondie, donc les résultats ne seront pas discutés dans ce mémoire.

Chapitre 5. Discussion

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de déterminer si la protéine γ -carboxylée GAS6 influence le métabolisme du glucose via l'activation d'au moins un de ses récepteurs sur la surface de cellules sensibles à l'insuline.

Des études chez l'humain suggèrent un rôle potentiel de GAS6 dans le développement de l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète. En ce qui concerne le diabète, les résultats de ces études sont variables, certains démontrant qu'une concentration élevée de GAS6 circulant dans le sang est associée avec la résistance à l'insuline et l'inflammation [77], tandis que d'autres montrent une faible concentration de GAS6 sanguin chez des patients nouvellement diagnostiqués avec le DT2 [120]. Chez la souris, les fonctions de GAS6 et de ses récepteurs ont été étudiées par exemple au niveau du système nerveux central [89], du système immunitaire [88], de l'apoptose et du cancer du sein [84, 93], mais très peu d'études portent sur le rôle de ces molécules au niveau du métabolisme. Il a été suggéré qu'une surexpression transgénique du récepteur *Axl* provoque un phénotype similaire au DT2 [123], et que la déficience en *Gas6* prévient la prise de poids lorsque les souris sont sur une diète riche en gras [124]. Cependant, les mécanismes et les cellules cibles impliqués dans ce processus sont encore inconnus.

Les résultats de ce projet ont permis de mettre en évidence un rôle de la protéine GAS6 au niveau de la sensibilité à l'insuline et du métabolisme du glucose. L'étude des souris *Gas6*^{-/-} a démontré que l'absence de *Gas6* induit une augmentation de la tolérance au glucose en réponse à un bolus de glucose intrapéritonéal. Cette augmentation de la tolérance au glucose peut être causée entre autres par une augmentation de la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques insulino-sensibles ou à une augmentation de la sécrétion d'insuline. Les tests de tolérance à l'insuline et de sécrétion d'insuline en réponse au glucose ont mis en évidence que la protéine GAS6 affecte la sensibilité à l'insuline, mais non la sécrétion de l'insuline par les cellules β . De plus, lorsqu'elles sont mises sur une diète riche en gras, les souris *Gas6*^{-/-} semblent protégées de la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose induite habituellement par la HFD, et ce sans perte de poids significative comparativement aux souris sauvages. Afin d'étudier plus en profondeur l'effet de GAS6 sur la signalisation de l'insuline, nous avons mis sur pied un protocole afin d'observer la phosphorylation de différents marqueurs de la voie de l'insuline *in vivo*, soit l'injection d'insuline via la veine cave. Cette méthode s'est avérée efficace afin d'observer au niveau moléculaire l'effet d'une délétion de GAS6 sur la réponse à l'insuline.

Cependant, les résultats obtenus en comparant les souris *Gas6*^{+/+} et *Gas6*^{-/-} n'étaient pas ceux que l'on attendait. En effet, malgré la sensibilité augmentée observée chez les souris *Gas6*^{-/-} lors d'un test de tolérance à l'insuline, la signalisation de l'insuline au niveau moléculaire semble diminuée dans le foie, le muscle et le tissu adipeux en absence de GAS6. Ces résultats semblent paradoxaux à première vue, puisqu'au niveau de ces trois tissus, il y a une perte de réponse à l'insuline, ce qui va dans le sens contraire du phénotype observé chez ces souris. Ces résultats suggèrent que la déficience en *Gas6* augmente la sensibilité à l'insuline *in vivo*, mais sans augmenter la voie de signalisation de l'insuline dans le muscle, le foie et le tissu adipeux. Une première hypothèse pour expliquer ces résultats serait que *Gas6* agit en aval de ces protéines pour augmenter la sensibilité à l'insuline, et qu'une boucle de rétroaction négative irait inhiber la voie de signalisation de l'insuline. Afin de tester cette hypothèse, d'autres marqueurs en aval de GSK3 devraient être analysés au niveau moléculaire afin d'identifier où agit GAS6 dans cette voie. Une deuxième hypothèse serait que nous avons manqué les événements de phosphorylation, puisque nous avons arrêté l'expérience 15 minutes suite à l'injection d'insuline. Les événements de phosphorylation sont très rapides et des événements de rétroaction négative viennent inhiber rapidement cette réponse. Alors, il serait intéressant de faire cette analyse moléculaire *in vivo* et d'étudier les événements de phosphorylation dans la signalisation 5 minutes après le bolus d'insuline, ou encore à des temps plus longs. Ces expériences permettront de mieux comprendre ces résultats en apparence contradictoires,

Au cours de ce projet, nous avons généré une souris transgénique surexprimant *Gas6* dans le foie afin d'observer si GAS6 était suffisant pour induire cette résistance à l'insuline. En effet, lors d'une déficience en *Gas6*, on remarque une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez la souris. L'étude de la lignée *ApoE-Gas6-84* a permis de mettre en évidence que l'augmentation de la concentration de GAS6 circulant est suffisante pour induire une diminution au niveau de la sensibilité à l'insuline, le phénotype inverse des souris *Gas6*^{-/-}. Lors de la génération d'une souris transgénique, il est important de s'assurer que la construction est exprimée au bon endroit, c'est-à-dire dans le foie dans le cas présent. Pour ce faire, nous avons récolté quelques tissus afin de mesurer l'expression du transgène *Gas6* par qPCR. Jusqu'à présent, nous avons mesuré l'expression dans certains tissus sensibles à l'insuline, soit le foie, le tissu adipeux blanc épидидymal, le muscle et le tissu adipeux brun. Il y a une surexpression

seulement dans le foie comme l'on s'y attendait, cependant il serait important de vérifier dans les autres tissus. De plus, puisque le foie est un tissu sensible à l'insuline, il se peut que cette surexpression cause un phénotype au niveau de la signalisation de l'insuline qui n'est pas dépendant de GAS6 ou induise de l'inflammation au niveau du foie. Une analyse au niveau de l'inflammation du foie se doit d'être effectuée afin d'écarter cette possibilité, par exemple par immunohistochimie. Cet aspect semble très important, puisqu'il a été suggéré que GAS6 joue un rôle au niveau de l'inflammation, que ce soit un rôle anti-inflammatoire [135, 136] ou pro-inflammatoire [77, 137].

Par la suite, l'étude de l'expression du gène *Gas6* et ses récepteurs *Tyros3*, *Axl* et *Mertk* dans les tissus de souris a permis de mettre en évidence qu'*Axl* est exprimé fortement dans les tissus insulino-sensibles, en particulier dans le muscle squelettique. Afin d'étudier les mécanismes moléculaires permettant à GAS6 d'influencer la sensibilité à l'insuline au niveau du muscle, nous avons mis en évidence que le récepteur AXL est présent et fonctionnel dans les C2C12 et qu'il y a une phosphorylation de ce récepteur dépendante de GAS6. Puisque AXL est aussi fortement exprimé au niveau du eWAT, il serait important d'effectuer les analyses *in vitro* sur des adipocytes, tels les 3T3-L1 différenciées. De façon préliminaire, nous avons observé une phosphorylation d'AXL en réponse à GAS6 dans les 3T3-L1 différenciées, tel qu'observé dans les C2C12, ce qui suggère que la signalisation GAS6-AXL est présente et fonctionnelle dans ces cellules.

Ensuite, les résultats du séquençage d'ARN ont permis de mettre des changements dans les gènes de plusieurs voies de signalisation modifiées transcriptionnellement par GAS6 et ses récepteurs TAM. Parmi les gènes modifiés, plusieurs sont regroupés sous la signalisation de l'insuline, ce qui est très intéressant pour ce projet, et aussi dans la voie de signalisation mTOR. L'analyse préliminaire effectuée à partir de ces données a permis de confirmer *in vivo* une diminution de l'expression chez les souris déficientes en *Gas6* de deux gènes de la signalisation de l'insuline, soient *Irs2* et *Eif4ebp1*. Dans la littérature, il a été démontré que la délétion d'IRS2 chez les souris entraîne un problème développemental au niveau du nombre de cellules β du pancréas [138]. De plus, chez les souris *ob/ob* lypodystrophiques, la diminution d'IRS2 et l'augmentation de SREBP1c entraînent une résistance à l'insuline [139]. Enfin, il a été démontré qu'IRS2 joue un rôle essentiel dans la stimulation de la translocation de GLUT4 par l'insuline

et dans la prise de glucose dans les tissus adipeux bruns [140]. Ces données montrent qu'effectivement, IRS2 est un candidat intéressant à étudier pour comprendre la perte de signalisation par l'insuline. Par contre, les changements d'expression d'IRS2 pourraient difficilement expliquer l'absence d'activation du récepteur de l'insuline puisqu'IRS2 est en aval de ce récepteur.

En ce qui concerne 4E-BP1, dans la littérature, une étude a montré qu'une activation de 4E-BP1 spécifiquement dans le muscle entraîne une augmentation de la sensibilité à l'insuline, comme ce qui est observé chez les souris *Gas6*^{-/-} [141]. Avec les résultats de séquençage d'ARN, il a été observé que GAS6 induit l'activation de PI3K et il est connu que la transcription de 4E-BP1 est régulée négativement par PI3K via FOXO1, qui est en aval de PI3K [142]. Donc, GAS6 active AXL, qui induit l'activation de PI3K, suivit d'AKT, ce qui inhibe l'expression de 4E-BP1. Dans les souris *Gas6*^{-/-}, il y a une augmentation de l'expression de 4E-BP1, et l'expression de 4E-BP1 est induite dans la condition des C2C12 traitées avec GAS6 et l'inhibiteur LDC1267. Ce candidat est très prometteur, il serait intéressant d'approfondir nos connaissances sur cette molécule en lien avec la signalisation de GAS6-récepteurs TAM. Une expérience qui pourrait apporter des réponses serait de montrer qu'il y a une phosphorylation de FOXO en réponse à GAS6, et que l'expression de 4E-BP1 est dépendante de l'activation de PI3K induite par Gas6. À l'aide de l'expérience d'injection d'insuline dans les souris *Gas6*^{+/+} et *Gas6*^{-/-}, la phosphorylation d'IRS2 et de 4E-BP1 pourrait être analysée, afin d'avoir une première idée de l'impact de GAS6 sur l'état de phosphorylation, donc d'activation de ces protéines.

Dans son ensemble, les résultats obtenus au cours de ce projet de maîtrise appuient le fait que GAS6 joue un rôle important dans la sensibilité à l'insuline, et que la signalisation par GAS6 et au moins un de ses récepteurs, soit AXL, influencent la sensibilité à l'insuline dans le muscle, selon un mécanisme encore inconnu.

Malgré ces effets néfastes de la protéine Gas6 sur le métabolisme du glucose, il est important de mentionner les fonctions bénéfiques de Gas6 sur l'organisme.

Selon la littérature, Gas6 participe à la régulation du cycle cellulaire, soit au niveau de la croissance et la survie cellulaire [97, 143]. En effet, la fonction de Gas6 dans la prolifération a été mise en évidence dans les fibroblastes en arrêt de croissance en l'absence de sérum. Selon

une étude, 60% des fibroblastes traités avec Gas6 entrent en phase de croissance, tandis que seulement 10% entrent en phase de croissance lorsque les cellules ne sont pas traitées [144]. Cette prolifération nécessite la liaison de Gas6 à son récepteur Axl, puisqu'il a été observé chez des rats que lorsque cette liaison est bloquée, il y a une diminution de 89% de la prolifération cellulaire mésangiale du glomérule. De plus, une étude a montré que lorsque des cellules HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*) sont prétraitées avec la protéine Gas6, il y a suppression de l'activation de Caspase 3, démontrant l'effet antiapoptotique de Gas6 [145].

Également, il a été montré que Gas6 jouent un rôle essentiel dans la vision, particulièrement dans le maintien de l'intégrité de la rétine. Des études *in vitro* ont démontré que Gas6 stimulent la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire rétinien, permettant le renouvellement de ces segments des photorécepteurs. Ce processus est nécessaire au bon fonctionnement des photorécepteurs, une perte de fonction au niveau de ce processus entraîne une dégénérescence des photorécepteurs [146].

Gas6 serait aussi impliquée dans la fonction osseuse, au niveau des ostéoclastes. En effet, le traitement d'ostéoclastes avec Gas6 augmente la réabsorption osseuse de 2,5 fois comparativement au contrôle. Cette fonction serait médiée par le récepteur Tyro3 [147, 148]. Puisque Gas6 a des fonctions physiologiques importantes pour l'organisme, il est important d'étudier plus en profondeur son effet sur le métabolisme énergétique, et de trouver une méthode d'inhiber ces effets néfastes sans toutefois empêcher cette protéine de jouer ses rôles physiologiques importants.

5.1 Expériences futures

Afin de déterminer sur quel tissu sensible à l'insuline la signalisation GAS6-AXL agit, nous allons générer une lignée de souris *Axl*^{-/-} conditionnelle dans le muscle (*Axl*^{mus/-}) à l'aide du système de recombinaison Cre-LoxP, soit la recombinaise HSA-Cre spécifique au muscle squelettique [149]. De plus, une transgénique *Axl*^{-/-} conditionnelle dans le gras (*Axl*^{wat/-}) sera aussi générée, en supprimant ce gène spécifiquement dans le tissu adipeux à l'aide de la

recombinase AdipoQ-Cre [150]. Le phénotype métabolique de ces deux lignées sera analysé en utilisant les tests effectués chez les souris *Gas6*^{-/-}, et ces résultats nous permettront de déterminer si AXL régule aussi le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline dans le muscle ou le gras. Ensuite, il serait intéressant d'observer la signalisation de l'insuline *in vivo* au niveau moléculaire en effectuant l'expérience d'injection d'insuline *in vivo* dans les souris *Axl*^{fl/fl}, *Axl*^{mus/-} et *Axl*^{wat/-}. L'obtention de résultats similaires à ceux obtenus avec les souris *Gas6*^{-/-} indiquera que la capacité de GAS6 à réguler la signalisation de l'insuline est dépendante de son récepteur AXL. Il serait intéressant par la suite de déterminer si la délétion d'*Axl* est suffisante pour complètement inhiber l'effet de GAS6 sur le métabolisme du glucose. Pour ce faire, on pourrait croiser les souris transgéniques *ApoE-Gas6-84* avec les souris *Axl*^{mus/-} et *Axl*^{wat/-} afin de déterminer si l'action de GAS6 sur le métabolisme du glucose dépend de la présence du récepteur AXL dans le muscle ou le tissu adipeux.

Un autre point important à éclaircir rapidement est de déterminer la source de Gas6 circulant et où Gas6 agit spécifiquement au niveau des tissus sensibles à l'insuline. En effet, il n'y a aucune donnée dans la littérature permettant de déterminer d'où provient Gas6, si cette protéine agit de façon endocrine ou paracrine. Cependant, il a été montré récemment dans la littérature qu'il y a une coexpression des protéines GAS6 et AXL, suggérant que GAS6 agit de façon autocrine et/ou paracrine [96]. La génération des souris *Axl*^{mus/-} et *Axl*^{wat/-} permettra de nous éclairer sur la cible de GAS6 au niveau des tissus sensibles à l'insuline, en observant si le phénotype métabolique de ces souris est similaire aux souris *Gas6*^{-/-}. Une autre expérience permettant de déterminer sur quel tissu agit GAS6 serait d'effectuer des clamps euglycémiques hyperinsulinémiques combinés à des traceurs radioactifs du glucose chez les souris *Gas6* +/- et *Gas6* -/-, afin de déterminer où va le glucose et de définir sur quel tissu agit GAS6.

Des études chez l'humain suggèrent que les niveaux de Gas6 corréleront fortement avec l'inflammation, l'adiposité et la résistance à l'insuline, suggérant qu'un ou des facteurs liés à l'obésité favorisent une production accrue de Gas6, augmentant ainsi la résistance à l'insuline par l'action directe sur les cellules sensibles à l'insuline. De plus, selon nos résultats, les souris *Gas6*^{-/-} semblent protégées de la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose induite par une diète riche en gras. Alors, il serait intéressant d'étudier l'effet d'une délétion de Gas6 sur des modèles animaux de résistance à l'insuline : soit les souris *db/db* (diabétiques) et les souris

ob/ob (obèses). Les souris *db/db* contiennent une mutation dans le gène du récepteur de la leptine, elles deviennent ainsi obèses et démontrent une hyperinsulinémie et une hyperglycémie, un bon modèle d'obésité associé au DT2 [151]. Quant à elles, les souris *ob/ob* ont une mutation dans le gène de la leptine et présentent une résistance à l'insuline suivie d'une défaillance des cellules β du pancréas [152]. D'abord, le phénotype métabolique des souris *ob/ob* et *db/db* déficientes en Gas6 serait analysé afin de déterminer si la protéine GAS6 peut prévenir l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie, et prévenir le développement de résistance à l'insuline chez les souris *db/db* et *ob/ob* comme dans les souris mises sur une HFD. La dépense énergétique pourrait aussi être mesurée à l'aide des cages métaboliques, afin de s'assurer que le phénotype obtenu n'est pas dû à un problème au niveau de la prise de nourriture ou de l'exercice par exemple. Une expérience intéressante serait d'utiliser les inhibiteurs R428 et LDC1267 pour traiter ces modèles animaux afin de bloquer la voie GAS6-récepteurs TAM (ou seulement AXL dans le cas du R428) et ainsi déterminer si Gas6 est impliqué dans le développement de la résistance à l'insuline de façon dépendante à ses récepteurs et/ou à AXL. En plus, des souris déjà obèses et insulino-résistantes pourraient être traitées avec ces inhibiteurs afin de tester si le fait d'inhiber la signalisation de GAS6-récepteurs TAM ou GAS6-AXL peut, en plus d'empêcher le développement de la résistance à l'insuline ou renverser l'effet délétère de la résistance à l'insuline induite par l'obésité. Si les tests s'avèrent concluants, un ou ces inhibiteurs pourraient s'avérer être une potentielle approche thérapeutique intéressante pour le traitement de la résistance à l'insuline via cette signalisation chez les patients souffrant de DT2.

La lignée transgénique générée durant ce projet pourrait aussi être utilisée afin d'avoir une idée de la cible de GAS6. En effet, avec l'ELISA contre la protéine GAS6, les niveaux protéiques de GAS6 dans les différents tissus peuvent être mesurés, et les tissus contenant une concentration plus élevée pourrait être de potentiels tissus cibles de GAS6. Lorsque la source et la cible de GAS6 seront connues, les souris transgéniques surexprimant Gas6 dans le foie pourront être très utiles pour étudier la phosphorylation d'AXL dans le tissu cible et observer la signalisation de l'insuline au niveau moléculaire. En effet, au cours de ce projet, nous avons tenté d'observer la phosphorylation d'AXL dans les tissus des souris *Gas6*^{+/+} et *Gas6*^{-/-} afin de voir si la délétion de Gas6 diminuait cette phosphorylation, toutefois les résultats n'étaient pas concluants. Donc, puisque les niveaux de GAS6 sont beaucoup plus élevés dans les souris

transgéniques *ApoE-Gas6*, il sera possible de comparer la phosphorylation d'AXL, et d'étudier la signalisation de l'insuline en réponse à cette augmentation chronique des niveaux circulants de GAS6.

En résumé, puisque Gas6 sembler favoriser une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline, comme le montre les analyses métaboliques des souris *Gas6* *-/-*, la voie Gas6 et ses récepteurs TAM pourrait être une cible thérapeutique prometteuse pour améliorer la sensibilité à l'insuline chez l'homme. L'inhibiteur LDC1267 pourrait être une molécule intéressante, il serait donc important d'effectuer des expériences *in vivo* afin de tester si cette molécule peut renverser l'effet de GAS6 sur la signalisation de l'insuline.

Chapitre 6. Conclusion

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de déterminer si la protéine γ -carboxylée GAS6 influence le métabolisme du glucose via l'activation d'au moins un de ses récepteurs sur la surface de cellules sensibles à l'insuline. Nous avons pu démontrer le rôle de GAS6 sur la sensibilité à l'insuline *in vivo* grâce à un modèle animal de déficience en Gas6. En effet, les souris présentent un phénotype métabolique différent des souris de type sauvages, soit une augmentation de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose. En plus, ces souris semblent protégées de l'induction d'une intolérance au glucose et d'une résistance à l'insuline par une diète riche en gras. La génération d'une souris transgénique surexprimant Gas6 dans le foie s'est avérée un outil important pour déterminer que GAS6 semble être suffisant pour induire une résistance à l'insuline chez la souris. Ensuite, l'étude de la signalisation de GAS6-AXL dans les cellules musculaires, soit les C2C12, a permis de déterminer qu'il y a une signalisation de GAS6 fonctionnelle et qu'AXL est phosphorylé de façon dépendante à GAS6. Donc, ces résultats ont contribué à déterminer le rôle de GAS6 dans le métabolisme du glucose et de l'insuline, et a permis d'identifier de nouvelles cibles potentielles de cette voie de signalisation, comme IRS2 et eIF4E-BP1.

Donc, puisque Gas6 semble favoriser une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline, la voie Gas6 et ses récepteurs TAM peut être une cible thérapeutique prometteuse pour améliorer la sensibilité à l'insuline chez les personnes souffrant de diabète de type 2.

Bibliographie

1. Diabètes, A.C.d. *Statistiques sur le diabète au Canada*. 2016; Available from: http://www.diabetes.ca/how-you-can-help/advocate/pourquoi-un-leadership-federal-est-essentiel/statistiques-sur-le-diabete-au-canada#_ftn1.
2. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. Lancet, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
3. Devendra, D., E. Liu, and G.S. Eisenbarth, *Type 1 diabetes: recent developments*. BMJ, 2004. **328**(7442): p. 750-4.
4. Québec, D. *Types de diabète*. 2014; Available from: <http://www.diabete.qc.ca/fr/comprendre-le-diabete/tout-sur-le-diabete/types-de-diabete>.
5. Québec, D. *Les symptômes*. 2014 [cited 2016 6 décembre]; Available from: <http://www.diabete.qc.ca/fr/comprendre-le-diabete/tout-sur-le-diabete/symptomes/les-symptomes>.
6. Santé, O.M.d.l., *Mieux connaître le diabète*. 2016.
7. Québec, D. *Comprendre le diabète : Complications*. 2014 [cited 2016 6 décembre]; Available from: <http://www.diabete.qc.ca/fr/comprendre-le-diabete/tout-sur-le-diabete/complications>.
8. Diabète, F.I.d. *Diabète*. 2003; Available from: https://www.idf.org/webdata/docs/background_info_AFR_FR.pdf.
9. Stolar, M.W. and R.J. Chilton, *Type 2 diabetes, cardiovascular risk, and the link to insulin resistance*. Clin Ther, 2003. **25 Suppl B**: p. B4-31.
10. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin*. N Engl J Med, 2002. **346**(6): p. 393-403.
11. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet β cell failure in type 2 diabetes*. Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(7): p. 1802-1812.
12. Doria, A., M.E. Patti, and C.R. Kahn, *The emerging genetic architecture of type 2 diabetes*. Cell Metab, 2008. **8**(3): p. 186-200.
13. Holt, R.I.G., *Textbook of diabetes*. 2010, Wiley-Blackwell,: Chichester, West Sussex. p. 1 texte électronique.

14. Nolan, C.J., P. Damm, and M. Prentki, *Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management*. Lancet, 2011. **378**(9786): p. 169-81.
15. Arsov, T., et al., *Adaptive failure to high-fat diet characterizes steatohepatitis in Alms1 mutant mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**(4): p. 1152-9.
16. Freemantle, N., et al., *How strong is the association between abdominal obesity and the incidence of type 2 diabetes?* Int J Clin Pract, 2008. **62**(9): p. 1391-6.
17. Kramer, H., et al., *Increasing BMI and waist circumference and prevalence of obesity among adults with Type 2 diabetes: the National Health and Nutrition Examination Surveys*. J Diabetes Complications, 2010. **24**(6): p. 368-74.
18. Santé, O.m.d.l., *Obésité et surpoids*. 2016.
19. Cole, T.J. and T. Lobstein, *Extended international (IOTF) body mass index cut-offs for thinness, overweight and obesity*. Pediatr Obes, 2012. **7**(4): p. 284-94.
20. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *What we talk about when we talk about fat*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 20-44.
21. Williamson, J.R., R.A. Kreisberg, and P.W. Felts, *Mechanism for the stimulation of gluconeogenesis by fatty acids in perfused rat liver*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1966. **56**(1): p. 247-254.
22. Bajaj, M., et al., *Free fatty acids reduce splanchnic and peripheral glucose uptake in patients with type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 3043-8.
23. Prentki, M. and B.E. Corkey, *Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?* Diabetes, 1996. **45**(3): p. 273-83.
24. Palou, A. and M.L. Bonet, *Challenges in obesity research*. Nutr Hosp, 2013. **28 Suppl 5**: p. 144-53.
25. Leahy, J.L., *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Arch Med Res, 2005. **36**(3): p. 197-209.
26. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Textbook of medical physiology*. 10th ed. 2000, Philadelphia: Saunders. xxxii, 1064 p.
27. Bouglé, A. and D. Annane, *Les effets de l'insuline : de la cellule à l'organisme entier*. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation, 2009. **28**(5): p. e193-e199.
28. Lodish, H., et al., *Biologie moléculaire de la cellule*. 2005: De Boeck Supérieur.
29. Magnan, C. and A. Ktorza, *Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique*. EMC - Endocrinologie, 2005. **2**(4): p. 241-264.

30. Mourad, N., M. Nenquin, and J.C. Henquin, *O6 Sécrétion biphasique d'insuline, cytosquelette et pools de granules*. Diabetes & Metabolism, 2011. **37**(1): p. A2.
31. Rorsman, P. and E. Renström, *Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells*. Diabetologia, 2003. **46**(8): p. 1029-1045.
32. MacDonald, M.J., et al., *Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(1): p. E1-15.
33. De Meyts, P. and J. Whittaker, *Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(10): p. 769-83.
34. Kido, Y., J. Nakae, and D. Accili, *The Insulin Receptor and Its Cellular Targets*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001. **86**(3): p. 972-979.
35. Thirone, A.C., C. Huang, and A. Klip, *Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(2): p. 72-8.
36. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
37. White, M.F., *Insulin Signaling in Health and Disease*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1710.
38. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-1274.
39. Guo, S., *Insulin Signaling, Resistance, and the Metabolic Syndrome: Insights from Mouse Models to Disease Mechanisms*. The Journal of endocrinology, 2014. **220**(2): p. T1-T23.
40. Hemmings, B.A. and D.F. Restuccia, *PI3K-PKB/Akt pathway*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a011189.
41. Nakae, J., et al., *The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression*. Journal of Clinical Investigation, 2001. **108**(9): p. 1359-1367.
42. Turner, N., *Mitochondrial Metabolism and Insulin Action*. Type 2 Diabetes. 2013.
43. Leng, S., et al., *Glycogen synthase kinase 3 beta mediates high glucose-induced ubiquitination and proteasome degradation of insulin receptor substrate 1*. J Endocrinol, 2010. **206**(2): p. 171-81.
44. Brown, G.K., *Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency*. J Inherit Metab Dis, 2000. **23**(3): p. 237-46.

45. Scheepers, A., H.G. Joost, and A. Schurmann, *The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2004. **28**(5): p. 364-71.
46. Guillam, M.T., P. Dupraz, and B. Thorens, *Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets*. Diabetes, 2000. **49**(9): p. 1485-91.
47. Thorens, B., et al., *Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells*. Cell, 1988. **55**(2): p. 281-90.
48. Shepherd, P.R. and B.B. Kahn, *Glucose Transporters and Insulin Action — Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus*. New England Journal of Medicine, 1999. **341**(4): p. 248-257.
49. Miinea, Cristinel P., et al., *AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain*. Biochemical Journal, 2005. **391**(Pt 1): p. 87-93.
50. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-293.
51. Jacinto, E., et al., *Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1122-8.
52. Sarbassov, D.D., et al., *Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton*. Curr Biol, 2004. **14**(14): p. 1296-302.
53. Brotelle, T. and J.-O. Bay, *La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie*. Bulletin du Cancer, 2016. **103**(1): p. 18-29.
54. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes & Development, 2004. **18**(16): p. 1926-1945.
55. Kawasome, H., et al., *Targeted disruption of p70(s6k) defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5033-8.
56. Tsukiyama-Kohara, K., et al., *Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1*. Nat Med, 2001. **7**(10): p. 1128-32.
57. Avruch, J., *Insulin signal transduction through protein kinase cascades*. Mol Cell Biochem, 1998. **182**(1-2): p. 31-48.

58. Schmelzle, T. and M.N. Hall, *TOR, a central controller of cell growth*. Cell, 2000. **103**(2): p. 253-62.
59. Shima, H., et al., *Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase*. Embo j, 1998. **17**(22): p. 6649-59.
60. Pende, M., et al., *Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 994-7.
61. Harrington, L.S., G.M. Findlay, and R.F. Lamb, *Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane*. Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**(1): p. 35-42.
62. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis*. Curr Biol, 2009. **19**(22): p. R1046-52.
63. Suttie, J.W., *Vitamin K in health and disease*. 2009, Boca Raton: CRC Press. xi, 224 p.
64. Nobelprize.org. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1943*. 2014; Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1943/.
65. Ball, G.F.M., *Vitamin K*, in *Vitamins*. 2008, Blackwell Publishing Ltd. p. 256-272.
66. Schurgers, L.J. and C. Vermeer, *Determination of phylloquinone and menaquinones in food. Effect of food matrix on circulating vitamin K concentrations*. Haemostasis, 2000. **30**(6): p. 298-307.
67. Shearer, M.J. and P. Newman, *Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis*. Journal of Lipid Research, 2014. **55**(3): p. 345-362.
68. Shearer, M.J. and P. Newman, *Metabolism and cell biology of vitamin K*. Thrombosis and Haemostasis, 2008. **100**(4): p. 530-547.
69. Nakagawa, K., et al., *Identification of UBLAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme*. Nature, 2010. **468**(7320): p. 117-21.
70. Girardot, J.M., R. Delaney, and B.C. Johnson, *Carboxylation, the completion step in prothrombin biosynthesis*. Biochem Biophys Res Commun, 1974. **59**(4): p. 1197-203.
71. Ferron, M. and J. Lacombe, *Regulation of energy metabolism by the skeleton: Osteocalcin and beyond*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014. **561**: p. 137-146.
72. Lacombe, J. and M. Ferron, *Gamma-carboxylation regulates osteocalcin function*. Oncotarget, 2015. **6**(24): p. 19924-19925.
73. Furie, B., B.A. Bouchard, and B.C. Furie, *Vitamin K-Dependent Biosynthesis of γ -Carboxyglutamic Acid*. Blood, 1999. **93**(6): p. 1798.

74. Adams, R.L.C. and R.J. Bird, *Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants*. Nephrology, 2009. **14**(5): p. 462-470.
75. Schurgers, L.J., E.C. Cranenburg, and C. Vermeer, *Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K*. Thromb Haemost, 2008. **100**(4): p. 593-603.
76. Ferron, M., et al., *GGCX and VKORC1 inhibit osteocalcin endocrine functions*. J Cell Biol, 2015. **208**(6): p. 761-76.
77. Hsiao, F.C., et al., *Circulating growth arrest-specific 6 protein is associated with adiposity, systemic inflammation, and insulin resistance among overweight and obese adolescents*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(2): p. E267-74.
78. DiNicolantonio, J.J., J. Bhutani, and J.H. O'Keefe, *The health benefits of vitamin K*. Open Heart, 2015. **2**(1): p. e000300.
79. Gallieni, M., et al., *Vitamin K and bone metabolism in the elderly with normal and reduced kidney function*. European Geriatric Medicine, 2013. **4**(1): p. 32-38.
80. Schneider, C., R.M. King, and L. Philipson, *Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells*. Cell, 1988. **54**(6): p. 787-93.
81. Manfioletti, G., et al., *The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4976-85.
82. Fernández-Fernández, L., L. Bellido-Martín, and P.G.d. Frutos, *Growth arrest-specific gene 6 (GAS6) - An outline of its role in haemostasis and inflammation*. Thrombosis and Haemostasis, 2008. **100**(10): p. 604-610.
83. Lemke, G., *Biology of the TAM Receptors*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013. **5**(11): p. a009076.
84. Abu-Thuraia, A., et al., *Axl Phosphorylates Elmo Scaffold Proteins To Promote Rac Activation and Cell Invasion*. Molecular and Cellular Biology, 2015. **35**(1): p. 76-87.
85. Fridell, Y.W., et al., *Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(1): p. 135-45.
86. Lu, Q., et al., *Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 723-8.
87. Xiong, W., et al., *Gas6 and the Tyro 3 receptor tyrosine kinase subfamily regulate the phagocytic function of Sertoli cells*. Reproduction, 2008. **135**(1): p. 77-87.

88. Graham, D.K., et al., *The TAM family: phosphatidylserine-sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(12): p. 769-785.
89. Tsou, W.-I., et al., *Receptor Tyrosine Kinases, TYRO3, AXL, and MER, Demonstrate Distinct Patterns and Complex Regulation of Ligand-induced Activation*. The Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(37): p. 25750-25763.
90. Lemke, G. and C.V. Rothlin, *Immunobiology of the TAM receptors*. Nature reviews. Immunology, 2008. **8**(5): p. 327-336.
91. LaVail, M.M., et al., *Gene Therapy for MERTK-Associated Retinal Degenerations*. Advances in experimental medicine and biology, 2016. **854**: p. 487-493.
92. Korshunov, V.A., et al., *Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling*. Circ Res, 2006. **98**(11): p. 1446-52.
93. Holland, S.J., et al., *Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9294-303.
94. Hasanbasic, I., I. Rajotte, and M. Blostein, *The role of gamma-carboxylation in the anti-apoptotic function of gas6*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(12): p. 2790-7.
95. Rajotte, I., I. Hasanbasic, and M. Blostein, *Gas6-mediated signaling is dependent on the engagement of its gamma-carboxyglutamic acid domain with phosphatidylserine*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **376**(1): p. 70-3.
96. Zagorska, A., et al., *Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function*. Nat Immunol, 2014. **15**(10): p. 920-8.
97. Li, R., et al., *Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells*. J Neurosci, 1996. **16**(6): p. 2012-9.
98. Nakano, T., et al., *Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors*. J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 5702-5.
99. Shankar, S.L., et al., *The growth arrest-specific gene product Gas6 promotes the survival of human oligodendrocytes via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway*. J Neurosci, 2003. **23**(10): p. 4208-18.
100. Sasaki, T., et al., *Structural basis for Gas6-Axl signalling*. The EMBO Journal, 2006. **25**(1): p. 80-87.
101. Korshunov, V.A., *Axl-dependent signaling: A clinical update*. Clinical science (London, England : 1979), 2012. **122**(8): p. 361-368.

102. Hubbard, S.R. and W.T. Miller, *Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling*. Current opinion in cell biology, 2007. **19**(2): p. 117-123.
103. Goruppi, S., et al., *Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras*. Oncogene, 1999. **18**(29): p. 4224-36.
104. Via, M., *The malnutrition of obesity: micronutrient deficiencies that promote diabetes*. ISRN Endocrinol, 2012. **2012**: p. 103472.
105. Kaidar-Person, O., et al., *Nutritional deficiencies in morbidly obese patients: a new form of malnutrition? Part A: vitamins*. Obes Surg, 2008. **18**(7): p. 870-6.
106. Kaidar-Person, O., et al., *Nutritional deficiencies in morbidly obese patients: a new form of malnutrition? Part B: minerals*. Obes Surg, 2008. **18**(8): p. 1028-34.
107. Mitri, J., M.D. Muraru, and A.G. Pittas, *Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review*. Eur J Clin Nutr, 2011. **65**(9): p. 1005-15.
108. Song, Y., et al., *Multivitamins, individual vitamin and mineral supplements, and risk of diabetes among older U.S. adults*. Diabetes Care, 2011. **34**(1): p. 108-14.
109. Sakamoto, N., et al., *Relationship between acute insulin response and vitamin K intake in healthy young male volunteers*. Diabetes Nutr Metab, 1999. **12**(1): p. 37-41.
110. Sakamoto, N., et al., *Possible effects of one week vitamin K (menaquinone-4) tablets intake on glucose tolerance in healthy young male volunteers with different descarboxy prothrombin levels*. Clin Nutr, 2000. **19**(4): p. 259-63.
111. Yoshida, M., et al., *Effect of vitamin K supplementation on insulin resistance in older men and women*. Diabetes Care, 2008. **31**(11): p. 2092-6.
112. Shea, M.K., et al., *Adulthood obesity is positively associated with adipose tissue concentrations of vitamin K and inversely associated with circulating indicators of vitamin K status in men and women*. J Nutr, 2010. **140**(5): p. 1029-34.
113. Ferron, M., et al., *Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(13): p. 5266-70.
114. Lacombe, J., G. Karsenty, and M. Ferron, *In vivo analysis of the contribution of bone resorption to the control of glucose metabolism in mice*. Mol Metab, 2013. **2**(4): p. 498-504.
115. Diamanti-Kandarakis, E., et al., *Serum concentrations of carboxylated osteocalcin are increased and associated with several components of the polycystic ovarian syndrome*. J Bone Miner Metab, 2011. **29**(2): p. 201-6.

116. Hwang, Y.C., et al., *The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects*. Diabetes Metab Res Rev, 2009. **25**(8): p. 768-72.
117. Kanazawa, I., et al., *Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus*. Osteoporos Int, 2011. **22**(1): p. 187-94.
118. Pittas, A.G., et al., *Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(3): p. 827-32.
119. Pollock, N.K., et al., *Lower uncarboxylated osteocalcin concentrations in children with prediabetes is associated with beta-cell function*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(7): p. E1092-9.
120. Hung, Y.J., et al., *Plasma protein growth arrest-specific 6 levels are associated with altered glucose tolerance, inflammation, and endothelial dysfunction*. Diabetes Care, 2010. **33**(8): p. 1840-4.
121. Hsiao, F.C., et al., *Effect of GAS6 and AXL Gene Polymorphisms on Adiposity, Systemic Inflammation, and Insulin Resistance in Adolescents*. Int J Endocrinol, 2014. **2014**: p. 674069.
122. Skopkova, M., et al., *Protein array reveals differentially expressed proteins in subcutaneous adipose tissue in obesity*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(10): p. 2396-406.
123. Augustine, K.A., et al., *Noninsulin-dependent diabetes mellitus occurs in mice ectopically expressing the human Axl tyrosine kinase receptor*. J Cell Physiol, 1999. **181**(3): p. 433-47.
124. Lijnen, H.R., V. Christiaens, and L. Scroyen, *Growth arrest-specific protein 6 receptor antagonism impairs adipocyte differentiation and adipose tissue development in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **337**(2): p. 457-64.
125. Maquoi, E., et al., *Role of Gas-6 in adipogenesis and nutritionally induced adipose tissue development in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(5): p. 1002-7.
126. Angelillo-Scherrer, A., et al., *Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 215-221.
127. Kajimura, D., et al., *Adiponectin regulates bone mass via opposite central and peripheral mechanisms through FoxO1*. Cell Metab, 2013. **17**(6): p. 901-15.
128. Inagaki, T., et al., *Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 415-25.

129. Zaid, A., et al., *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration*. Hepatology, 2008. **48**(2): p. 646-54.
130. Kim, D.-H., et al., *Increased adipose tissue hypoxia and capacity for angiogenesis and inflammation in young diet-sensitive C57 mice compared to diet-resistant FVB mice*. International journal of obesity (2005), 2013. **37**(6): p. 853-860.
131. Berkner, K.L., et al., *Purification and identification of bovine liver gamma-carboxylase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(14): p. 6242-6246.
132. Thiebaud, D., et al., *The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man*. Diabetes, 1982. **31**(11): p. 957-63.
133. Holland, S.J., et al., *R428, a Selective Small Molecule Inhibitor of Axl Kinase, Blocks Tumor Spread and Prolongs Survival in Models of Metastatic Breast Cancer*. Cancer Research, 2010. **70**(4): p. 1544.
134. Paolino, M., et al., *The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells*. Nature, 2014. **507**(7493): p. 508-512.
135. Rothlin, C.V., et al., *TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1124-36.
136. Deng, T., et al., *Toll-like receptor-mediated inhibition of Gas6 and ProS expression facilitates inflammatory cytokine production in mouse macrophages*. Immunology, 2012. **135**(1): p. 40-50.
137. Fourcot, A., et al., *Gas6 deficiency prevents liver inflammation, steatohepatitis, and fibrosis in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(6): p. G1043-53.
138. Kido, Y., et al., *Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2*. The Journal of Clinical Investigation, 2000. **105**(2): p. 199-205.
139. Shimomura, I., et al., *Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 77-86.
140. Fasshauer, M., et al., *Essential role of insulin receptor substrate-2 in insulin stimulation of Glut4 translocation and glucose uptake in brown adipocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25494-501.
141. Tsai, S., et al., *Muscle-specific 4E-BP1 signaling activation improves metabolic parameters during aging and obesity*. J Clin Invest, 2015. **125**(8): p. 2952-64.

142. Azar, R., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent transcriptional silencing of the translational repressor 4E-BP1*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(19): p. 3110-7.
143. Nakano, T., et al., *Requirement of gamma-carboxyglutamic acid residues for the biological activity of Gas6: contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells*. Biochem J, 1997. **323 (Pt 2)**: p. 387-92.
144. Goruppi, S., E. Ruaro, and C. Schneider, *Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts*. Oncogene, 1996. **12**(3): p. 471-80.
145. Hasanbasic, I., et al., *Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(3): p. H1207-13.
146. Hall, M.O., et al., *Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells*. Exp Eye Res, 2005. **81**(5): p. 581-91.
147. Nakamura, Y.S., et al., *Tyro 3 receptor tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts*. Stem Cells, 1998. **16**(3): p. 229-38.
148. Katagiri, M., et al., *Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7376-82.
149. Miniou, P., et al., *Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(19): p. e27.
150. Eguchi, J., et al., *Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4*. Cell Metab, 2011. **13**(3): p. 249-59.
151. Coleman, D.L., *Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice*. Diabetologia, 1978. **14**(3): p. 141-8.
152. Lindström, P., *The Physiology of Obese-Hyperglycemic Mice [ob/ob Mice]*. TheScientificWorldJOURNAL, 2007. **7**.